f 4224

Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

I. N. R. A.
SERVICE DE DOCUMENTATION
25. OCT. 1982
CENTRE CENTRALE DE VERSAILLES

VOL. 8

1979

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

LB-9

COMPTE RENDU
SCIENTIFIQUE

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION ..... p. 1

COMPTE RENDU SCIENTIFIQUE ..... p. 2 à 34

Chap. I - Régulation hormonale de la glycémie chez l'Abeille. (M. BOUNIAS) ..... p. 2

Chap. II - Régulation enzymatique de la glycémie chez l'Abeille. (M. BOUNIAS) ..... p. 3 à 8

Chap. III - Relations glycémie/Productivité.(M. BOUNIAS et M.R.J. MORGAN) ..... p. 9 à 16

Chap. IV - L'inductibilité de l'activité des α-glucosidases. (M. BOUNIAS et M.R.J. MORGAN) ..... p. 17 à 27

Chap. V - Analyse chromatographique des glucides à l'échelle de la picomole. (M. BOUNIAS) ..... p. 28 à 32

Chap. VI - Les α-glucosidases intestinales des oniscoïdes p. 33

Chap. VII - Ouvrages ..... p. 34

COMPTE RENDU FINANCIER ..... p. 35 à 37

I - Attributions pour 1979 ..... p. 35 à 36

II - Prévisions pour 1980 ..... p. 36 à 37

BIBLIOGRAPHIE ..... p. 38 à 40

A - Derniers titres parus venant s'ajouter et la liste des travaux du laboratoire ..... p. 38

B - Impact extérieur ..... p. 38 à 40

CONCLUSION ..... p. 41 à 44

ANNEXE

BILAN DES PUBLICATIONS ..... p. 45 à 49

I - Publications originales parues et sous presse ..... p. 45 à 47

II - Communications originales en Colloques/Congrés ..... p. 48

III - Mémoires de diplômes ou thèses ..... p. 49

IV - Rapports scientifiques non publiés (disponibles) ... p. 49

INTRODUCTION

Au cours de l'Année 1979, l'activité scientifique du Laboratoire de Biochimie a poursuivi l'accélération qu'avait favorisée, en 1978, la libération effective des moyens spécifiques (ligne budgétaire : 21-291 AVIGNON-BIOCHIMIE) qui lui avaient été attribués par décision du 25 octobre 1976.

Les publications parues étant, par elles-mêmes, plus éloquentes qu'aucun autre commentaire, ce rapport sera limité à une vue d'ensemble aussi concise que possible. Parmi les points importants à souligner pour 1979, il convient de mentionner dès à présent l'accueil pour une période sabbatique de 4 mois du Docteur M.R.J. MORGAN, Reader in Biochemistry à l'Université de Lancaster (Grande Bretagne), spécialiste renommé des osidases d'Insectes, qui a bien voulu choisir le Laboratoire de Biochimie pour partenaire dans une perspective de Collaboration à long terme, et l'attribution de l'un des Prix de la Société de Biologie (Collège de France) à M. BOUNIAS, pour l'ensemble de ses travaux.

Chapitre I - REGULATION HORMONALE DE LA GLYCEMIE CHEZ L'ABEILLE. (M. BOUNIAS)

Les calculs de dépouillement des travaux sur l'action de l'Adrénaline de l'insuline et du glucagon ont été poursuivis sur la base d'une méthode mathématique de dosage associée à l'emploi d'un nouveau réactif des glucides découvert au Laboratoire de Biochimie (cf. chap. V).

a) Deux publications préparées à titre de " prises de dates ", en collaboration avec le Professeur PACHECO, directeur du Service de Biochimie de l'Institut National des Sciences Appliquées de LYON, ont été publiées aux Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, présentées par Monsieur le Recteur Jean ROCHE (1) (2).

b) L'étude des spectres d'absorption observés dans les solutions d'adrénaline au cours de son oxydation spontanée (cf. C.R.Act. LBC vol.7, 1978) a été effectuée en relation avec le DR. I. KRUK, spécialiste de la physico-chimie de l'adrénaline et de ses dérivés à l'Institut de Physique du POLITECHNIKA SECZECINSKA. Les résultats permettent d'identifier, à l'état d'équilibre, la présence de 0,2 mM d'adrénochrome dans une solution titrant initialement 0,5 mM d'adrénaline, ce qui explique l'effet de saturation des récepteurs observé en 1978. Une co-publication est en préparation.

c) La recherche d'hormones endogènes a été entreprise grace à la collaboration établie avec le DR. DUBOIS (INRA-TOURS). Les travaux ont abouti à une très nette mise en évidence de la présence de somatostatine dans des cellules de l'intestin de l'Abeille. Cette découverte renforce la valeur des résultats précédents et ouvre de vastes perspectives !

d) Une étude des relations doses/effets de l'insuline et du glucagon est parue dans le dernier numéro des C.R. Soc. Biol. (3).

e) L'injection de noradrénaline, dopamine et dopa a montré des effets hyperglycémiques obtenus après des durées respectives croissantes. Une publication est en préparation pour les Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie (Liège).

Chapitre II - REGULATION ENZYMATIQUE DE LA GLYCEMIE CHEZ L'ABEILLE. (M. BOUNIAS)

a) Relations in vivo.

Le dépouillement des travaux sur les relations entre les paramètres d'activité α-glucosidasique et la glycémie s'est poursuivi jusqu'à la mise au point d'une publication parue dans comparative Biochemistry (4). La figure 1 en résume les principaux résultats.

b) Relations in vitro.

Les divers aspects des résultats illustrant l'étude de l'action du glucose sur les paramètres de l'activité α-glucosidasique ont été publiés respectivement aux C.R. de la Société de Biologie (5) et dans la revue Experientia (6). Les corrélations mises en évidence dans ce dernier cas sont illustrées par la figure 2 ; elles suggèrent, au travers des variations d'activité observées au cours du développement, la notion d'une " unité physiologique " peu compatible avec l'hypothèse (ou l'objection) d'une " diversité moléculaire ". Cette question est particulièrement importante du fait des possibilités de passage des cinétiques du type à " coopérativité négative " au type à " coopérativité positive ". Ceci nous amène à la théorie sur le mécanisme moléculaire des α-glucosidases, telle qu'elle évolue et se précise, depuis quelques années, au fil de l'expérimentation et de la réflexion.

c) Mécanisme moléculaire d'activité α-glucosidasique.

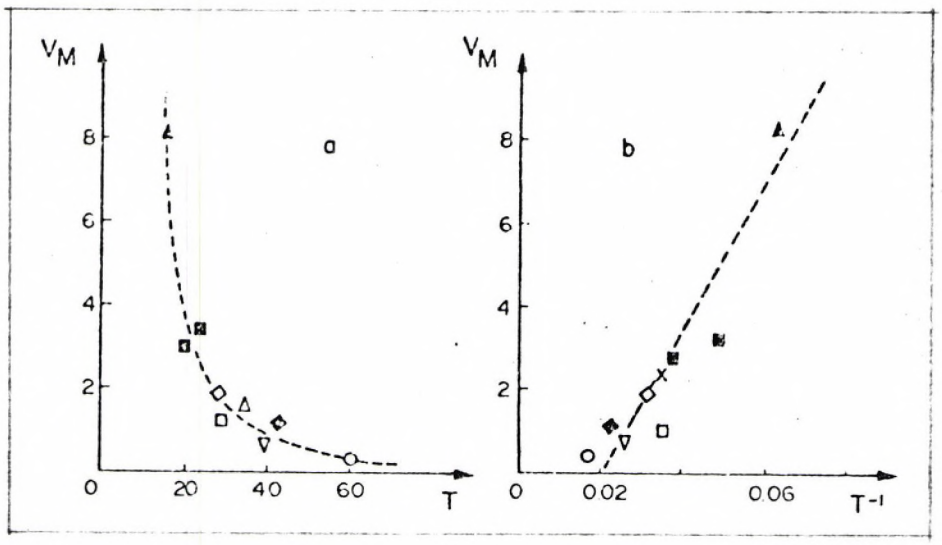
La théorie échaffaudée à partir des travaux réalisés depuis 1974 aboutit actuellement à une interprétation de la signification du coefficient de HILL.

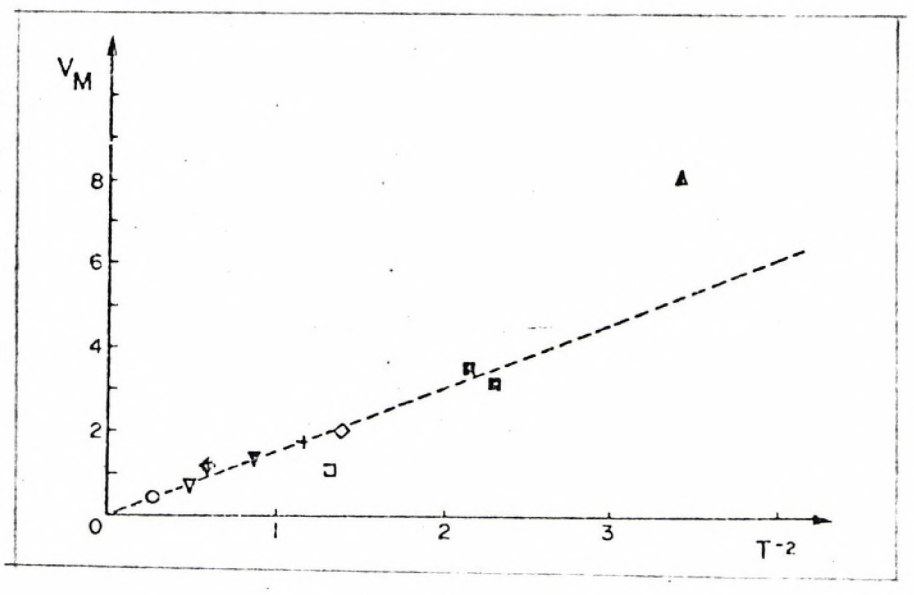
Le coefficient de HILL est le " 3e paramètre " (n) s'exprimant dans l'équation générale :

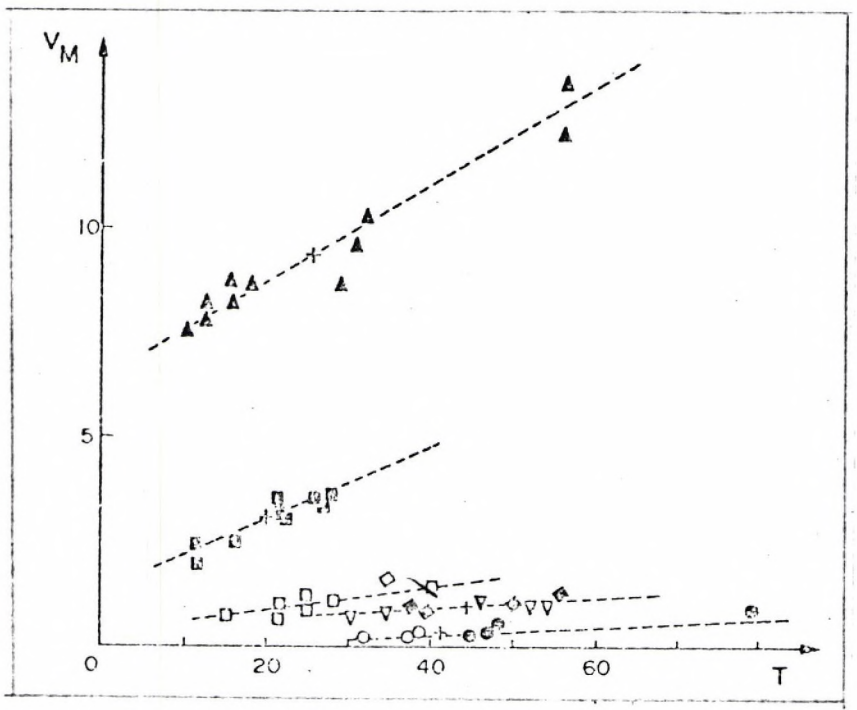
$$V = \frac{V_M \cdot S^n}{K + S^n} \qquad [I]$$

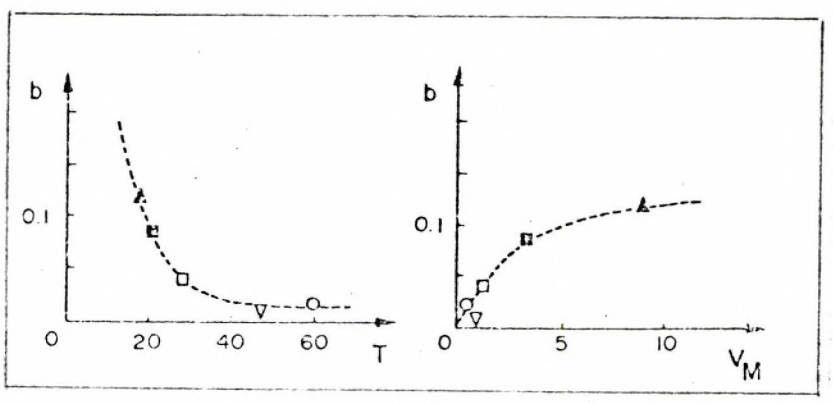
(V = vitesse initiale
(S = concentration en substrat
(V_M = vitesse maximale
(K = constante d'affinité

On admet souvent que (n) représente une illustration du bilan du nombre de molécules de substrat " traitées " par molécule d'enzyme, soit : $E + n\,S \rightleftharpoons [\text{Complexe } E\text{-}S] \rightleftharpoons \text{Produits} + E$ [II]









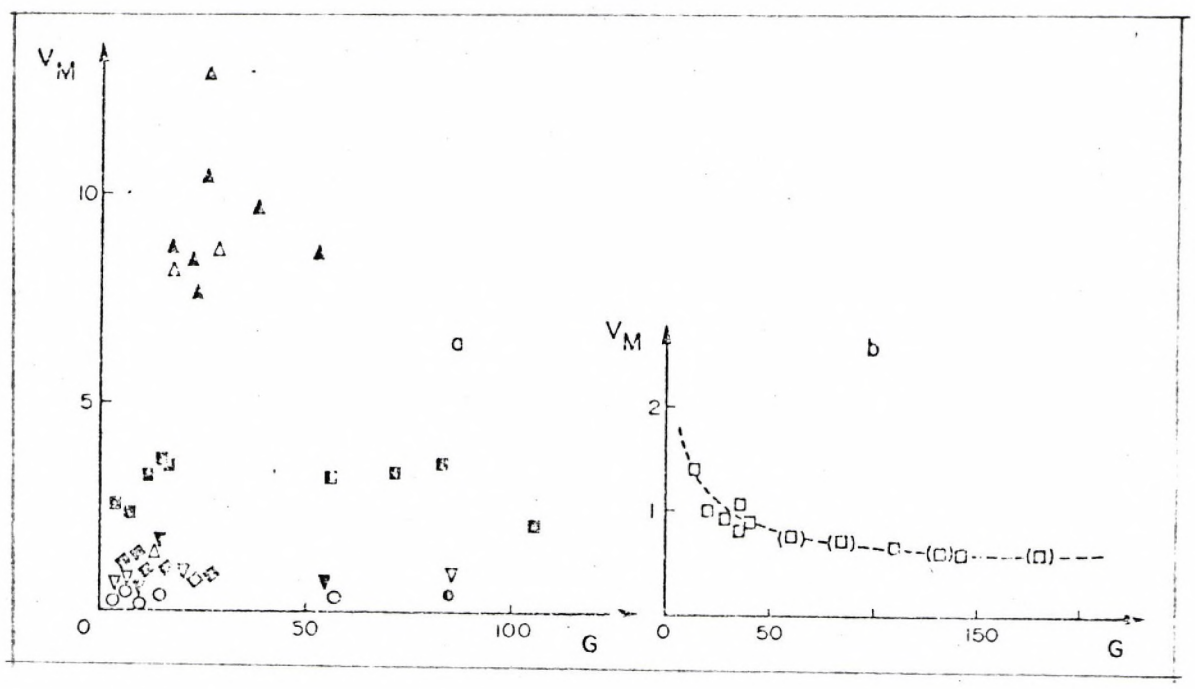


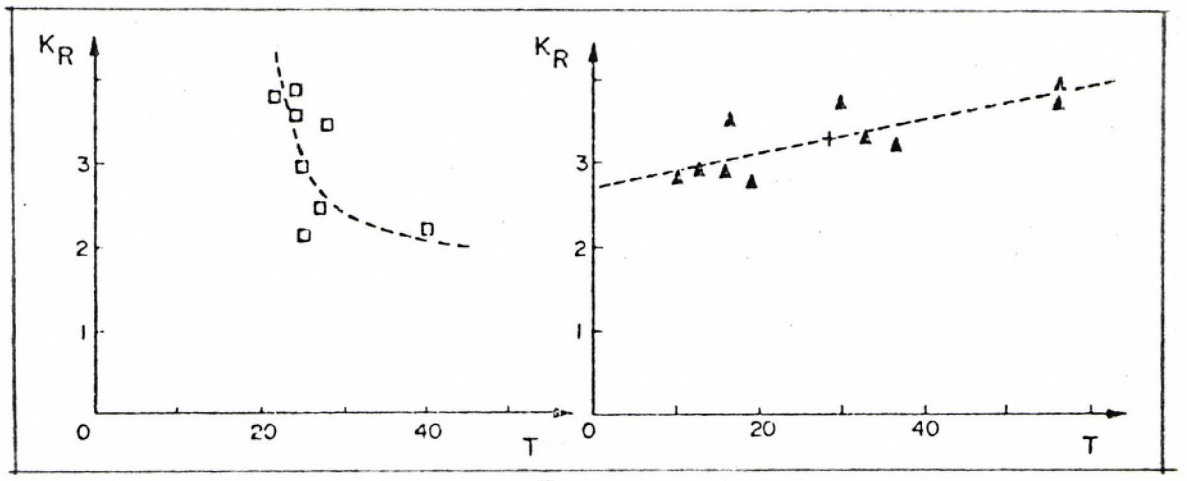
Figure 1 - Corrélations in vivo entre les paramètres α-glucosidasiques résultants (V_M, K_R, n_R) et les teneurs de l'hémolymphe en tréhalose (T) et glucose (G). Les stades du développement sont symbolisés ainsi :

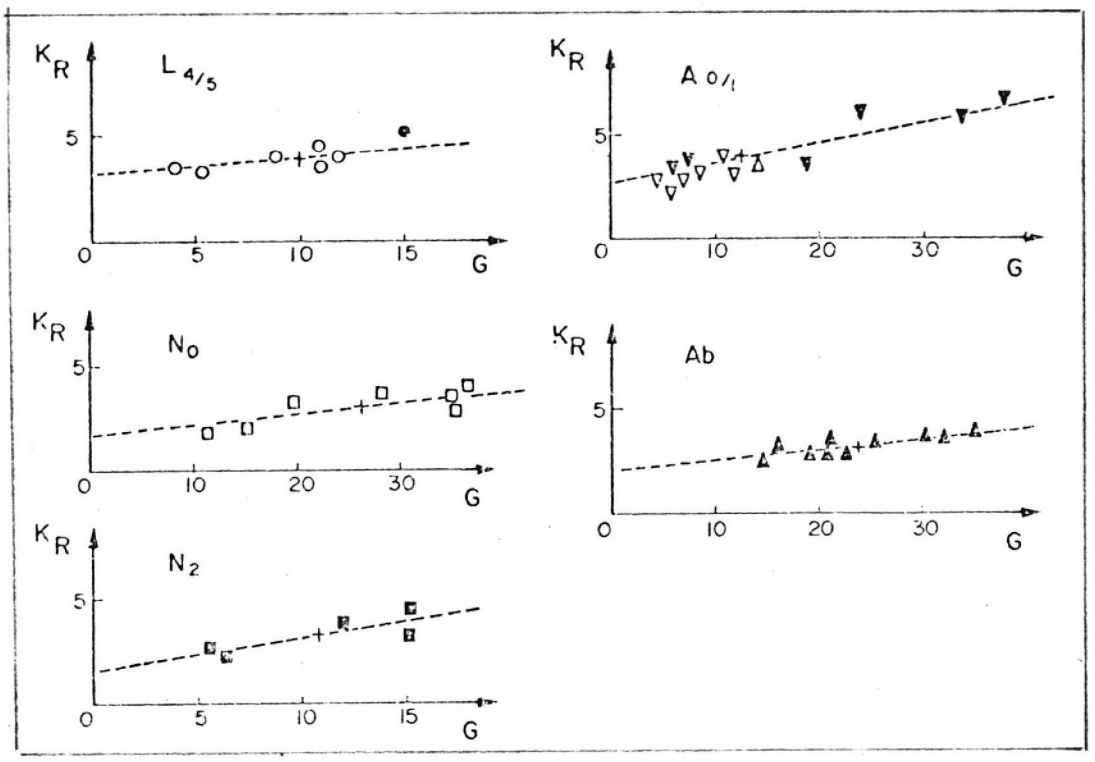
(○) = L4 ; (●) = L5 ; (□) = No ; (■) = N2 ; (◇) = N3 à N4 ; (◆) = N5 à N6 ; (▽) = Ao ; (▼) = A1 ; (△) = A7 ; (▲) = Ab.

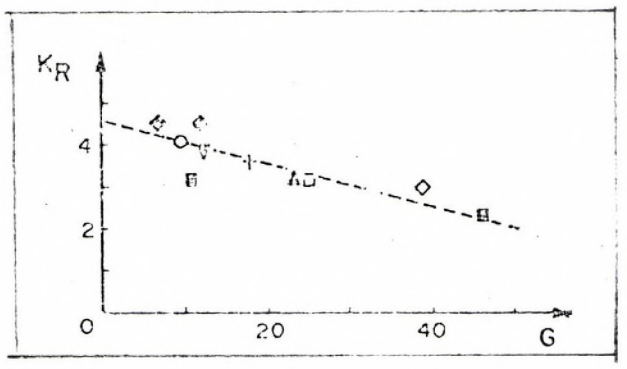
1-1 = Relation entre V_M et T pour l'ensemble du développement.

1-2 = Relations stade par stade avec variations de la pente d' " induction " (b) en fonction de T et de V_M.

1-3 = Relations entre V_M et G.







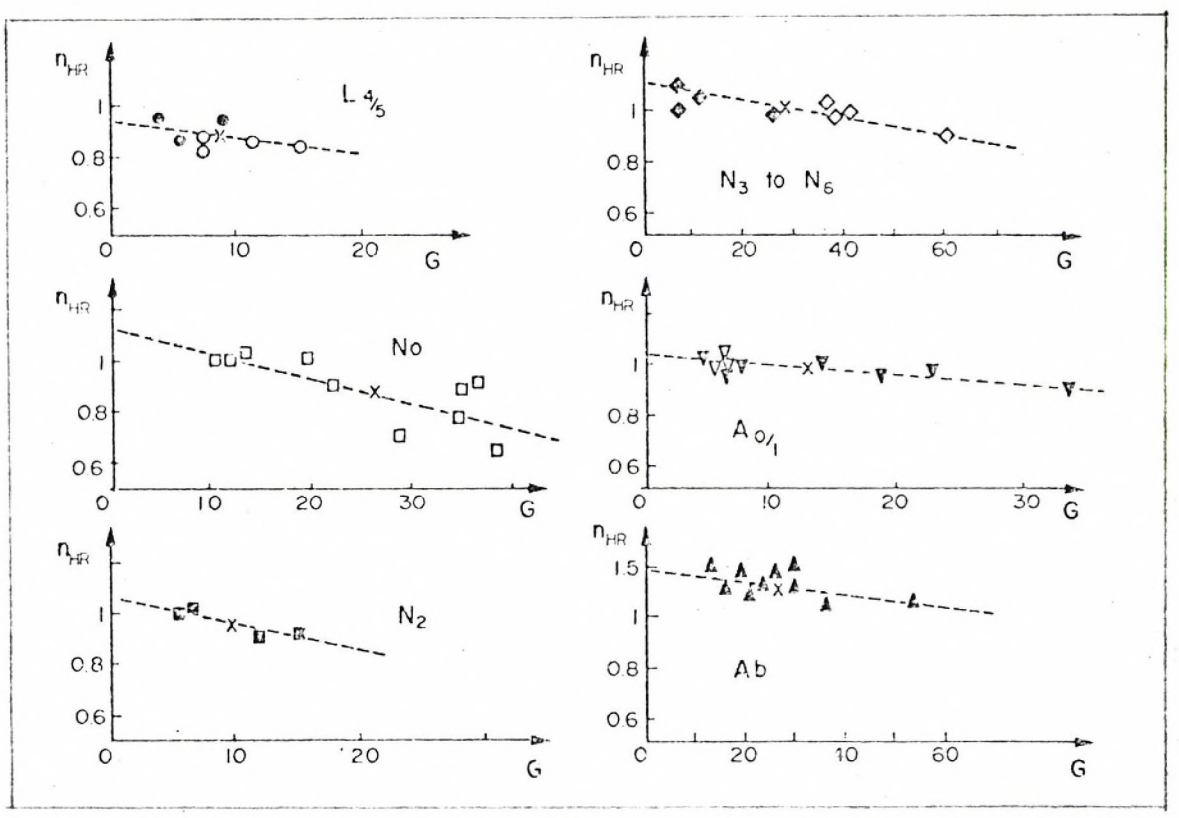


Figure 1 (suite)

1-4 = Relations entre K_R et T.

1-5 = Relations entre K_R et G.

1-6 = Relations entre n_R et G.

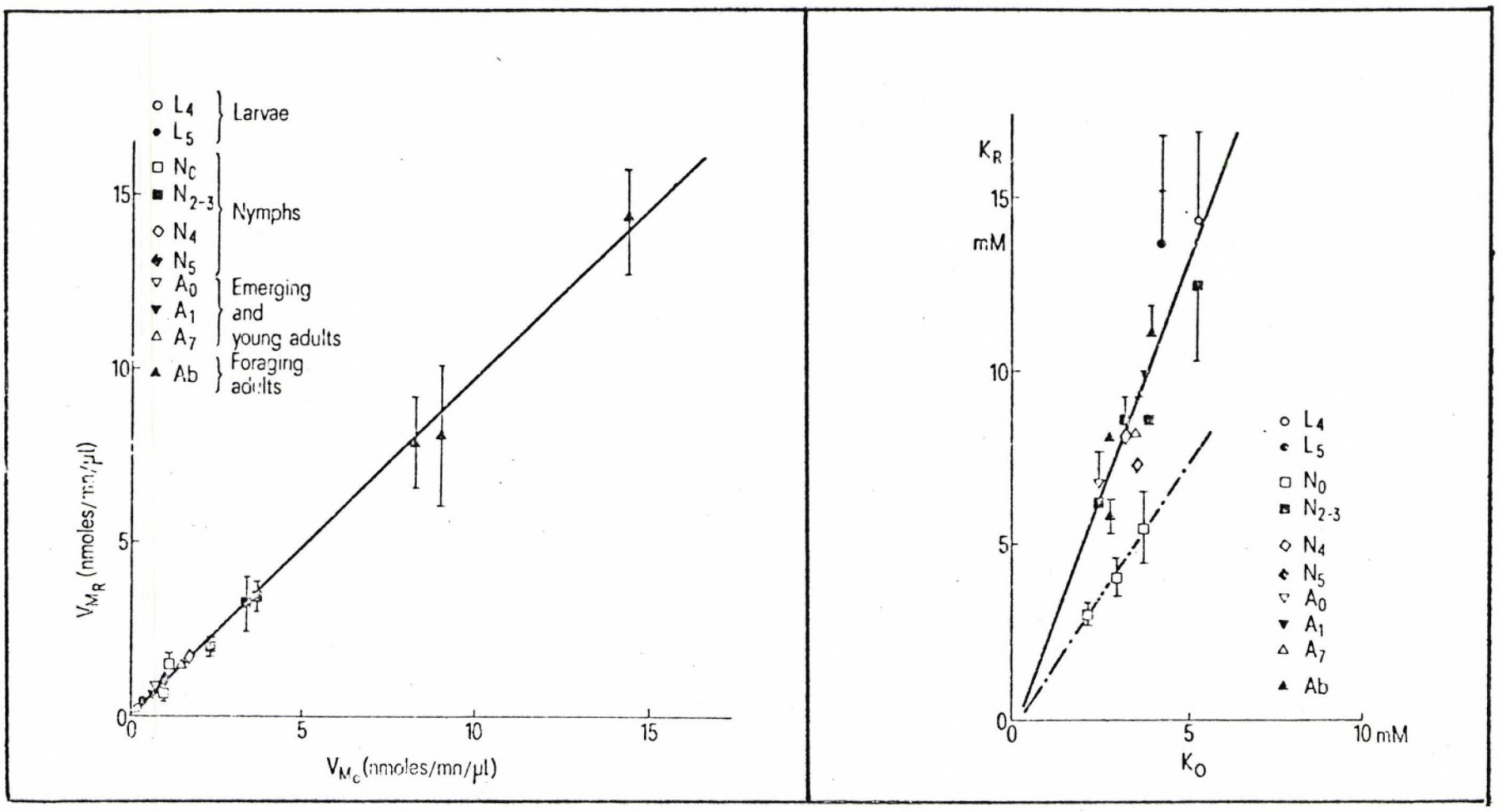


Figure 2 - Corrélations entre les paramètres α-glucosidasiques témoins (V_M, K et n) et ceux mesurés en présence de glucose *in vitro* (V_{MR}, K_R, n_R).

Or, dans la réalité, nous supposerons que n_E molécules d'enzyme " collaborent "... ou " coopèrent "... pour traiter n_S molécules de substrat, soit :

$$n_E\ E + n_S\ S \rightleftharpoons [\text{complexe E-S}] \rightleftharpoons \text{Produits} + n_E\ E \qquad [III]$$

Nous pouvons dès lors écrire :

$$E + \frac{n_S}{n_E}\ S \rightleftharpoons \text{etc.} \quad \text{soit :} \quad \boxed{n = \frac{n_S}{n_E}} \qquad [IV]$$

A partir de divers cas concrets, nous avons calculé d'une part la valeur des paramètres n_E et n_S par les méthodes de la cinétique chimique classique, soit :

$$V_1 = K_1\ [E]^{n_E} \cdot [S]^{n_S} \qquad [V]$$

d'où l'on tire :

pour [S] fixe $\quad V_1 = f_E \cdot [E]^{n_E}$ avec $f_E = K_1 \cdot [S]^{n_S}$ = constante

pour [E] fixe $\quad V_1 = f_S \cdot [S]^{n_S}$ avec $f_S = K_1 \cdot [E]^{n_E}$

(sous réserve d'être suffisamment éloigné de la saturation).
Les formes logarithmiques permettent le calcul des ordres partiels n_E et n_S ainsi que de la constante K_1, soit :

$$LN\ V_1 = n_E \cdot LN\ [E] + LN\ f_E \qquad [VI]$$

$$LN\ V_1 = n_S \cdot LN\ [S] + LN\ f_S \qquad [VII]$$

... et d'autre part la valeur du paramètre n issu de l'équation [I] en utilisant les méthodes algébriques rigoureuses de ENDRENYI et Coll. (1975)* et de BOUNIAS (1979)**.

Les résultats suivants se passent d'autres commentaires.

- <u>cas de nymphes au stade No</u>

  vitesses déterminées pour [E] variant de 1 à 8 µl

  [S] variant de 0,25 à 2,5 mM

  calcul des ordres partiels : $n_E = 0{,}763$) $\frac{n_S}{n_E} = 0{,}668$
  $n_S = 0{,}510$)

  calcul du coefficient de HILL : $n = 0{,}710 \pm 0{,}08$

- <u>stade No avec inhibition par le glucose in vitro</u>

  G = 50 mM

* ENDRENYI et al. (1975)

** BOUNIAS (1978) C.R. Soc. Biol. <u>172</u>(5), 855-859.
(1979) Comp. Biochem. <u>63B</u>, 407-417.

ordres partiels : $n_E = 0,740$) $\frac{n_S}{n_E} = 0,580$
$n_S = 0,430$)

coefficient de HILL : n = (0,63) 0,59 ± 0,04
(0,54)

- Adultes butineuses

[S] varie de 0,3 à 3 mM

[E] varie de 0,5 à 1 µl

ordres partiels : $n_E = 0,577$) $\frac{n_S}{n_E} = 1,39$
$n_S = 0,813$)

coefficient de HILL : n = 1,34

- Discussion

Le quotient des ordres partiels coïncide avec les valeurs du coefficient de HILL, mais les valeurs de n_E et n_S ne sont pas entières ... ceci confirme l'idée, suggérée dans le rapport 1978, que plusieurs molécules d'enzyme se groupent à l'état naturel pour " coopérer " (au sens propre) à la réaction finale sous forme d'un ensemble de N sous unités. Les résultats obtenus confirment que N pourrait être égal à 8. Une molécule d'enzyme active ne doit plus être considérée comme telle mais comme l'association de n_E x N sous ensembles constitués par des oligomères ou des polymères de faible degré d'association.

L'étude de la structure moléculaire de l'enzyme revêt donc maintenant une importance de premier plan : cette orientation a été reprise dès l'arrivée du DR. MORGAN, en complément aux autres travaux réalisés en collaboration, et sera poursuivie au cours des années suivantes.

Chapitre III - RELATIONS GLYCEMIE / PRODUCTIVITE.
(M. BOUNIAS et M.R.J. MORGAN)

L'étude conduite avec succès en 1978 sur les Abeilles adultes agées, a été reprise en collaboration avec le DR. MORGAN sur les naissantes.

Dans ce cas, seuls le glucose et le tréhalose ont été étudiés (le niveau de la fructosémie était trop faible pour donner lieu à des interprétations significatives).

a) Les relations entre glycémie et productivité ont été parfaitement confirmées, y compris au niveau du non-respect de l'effet d'hétérosis par les hybrides triples. Les moyennes des résultats sont indiquées, à " l'état brut " dans le tableau nº1, illustré par la figure 3.

Cependant la variabilité glycémique intra-raciale des naissantes s'est avérée importante par rapport aux différences de glycémies moyennes inter-raciales, de sorte que les Abeilles naissantes apparaissent comme moins caractéristiques que les Butineuses, ce qui n'est pas exempt d'une certaine logique (le rendement est produit par les butineuses !). Il semble donc que la corrélation biochimique soit renforcée dans le cas de la glycémie par la corrélation éthologique, mais ceci n'exclut pas que d'autres facteurs biochimiques puissent offrir de bons critères dès les premiers stades du développement.

Enfin, l'étude d'effets " anticipés " ou d'effets " retard " entre glycémies et rendements d'une année à une autre, est en cours à partir des données numériques obtenues pour une même série de colonies en 1978 et 1979.

b) Les paramètres cinétiques α-glucosidasiques ont été systématiquement déterminés pour chacune des colonies examinées. Les résultats préliminaires, obtenus à partir des représentations de Hofstee/Augustinsson et de l'équation de HILL, sont résumés dans le tableau nº2. Une analyse détaillée semble devoir faire apparaître de nouvelles corrélations dues à l'inter-dépendance des paramètres α-glucosidasiques et de la glycémie in vivo (cf. Chap. II-a).

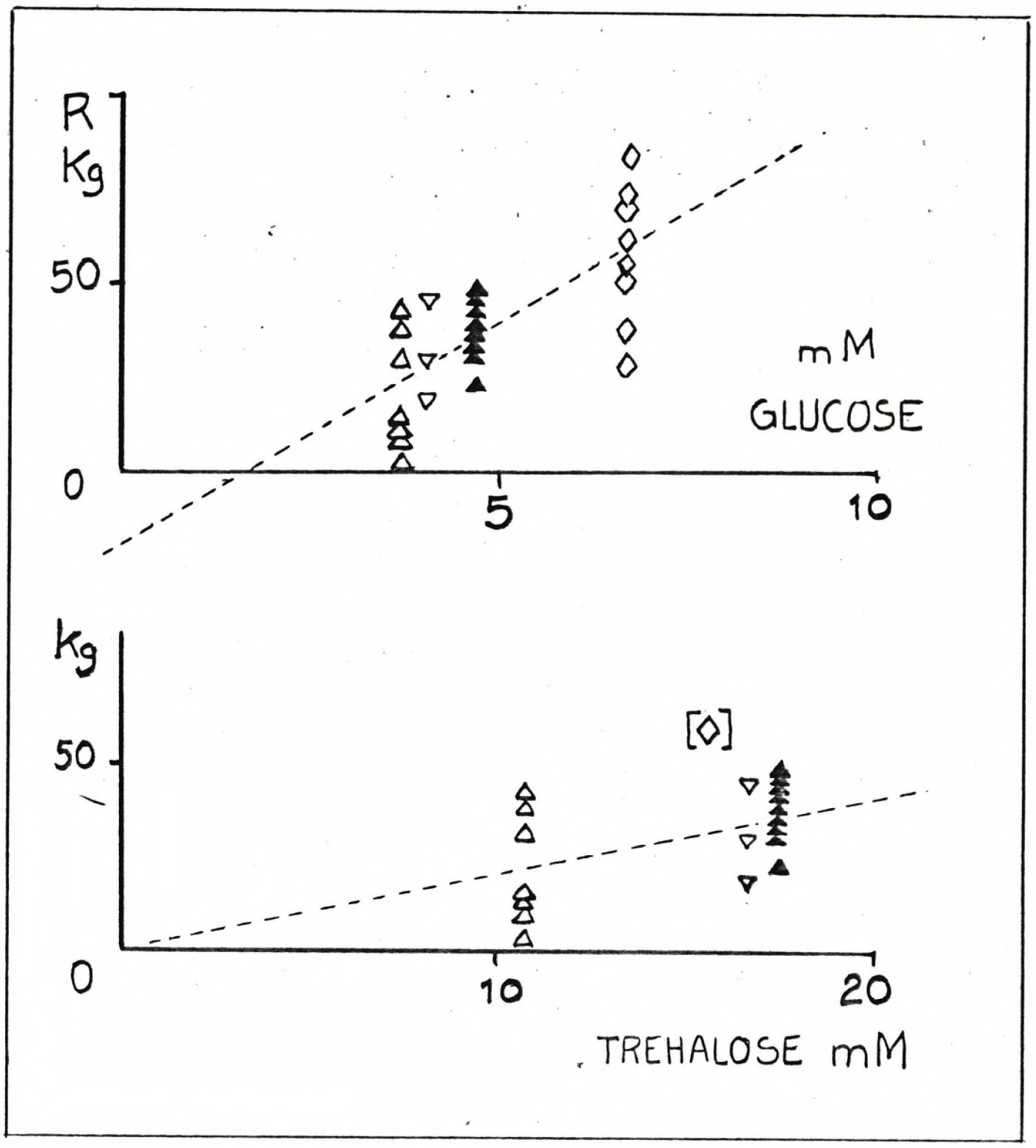


Figure 3 - Corrélations entre la glycémie des Abeilles naissantes (juin 1979) et le rendement des colonies correspondantes (septembre 1979).

Tableau 1 - Glycémie des Abeilles naissantes et Productivité finale des colonies en 1979 (résultats partiels).

Races	Glycémie $\bar{x}$ (N) x	Tréhalosémie $\bar{x}$ (N) x	Productivité $\bar{x}$ (N) x
Ligustica	3,77 (14) 1,23	10,79 (16) 5,49	21,5 (7) 17,53
Caucasica	3,97 (6) 0,69	16,84 (6) 6,12	31,66 (3) 13,38
Mellifica	4,69 (16) 1,47	17,45 (16) 4,69	36,94 (9) 7,60
Hybrides	6,60 (24) 2,68	13,34 (24) 6,34	58,95 (11) 19,25

Corrélations

P/G : $\rho = 0,984$ $a = -19,24$ $b = 11,93$ $-\frac{a}{b} = 1,62$

P/T :

(races pures $\rho = 0,965$ $a = -0,730$ $b = 2,048$ $-\frac{a}{b} = 0,356$

(avec hybrides $\rho = 0,458$ $a = 0,981$ $b = 2,397$ $-\frac{a}{b} = 0,409$

Tableau 2 - Paramètres cinétiques α-glucosidasiques déterminés comparativement chez diverses races d'Abeilles. (résultats partiels)

Colonies	R-Kg	V_M µM/mn/µl HOFSTEE	Km HOFSTEE	Km HILL	V_M/Km HOFSTEE	n HILL
Lo ...		16,99	1,76	1,76	9,65	1,016
L2 ...	33	16,76	2,30	2,295	7,29	1,007
L3 ...	12,5	22,04	2,85	2,90	7,73	1,07
L4 ...		12,55	2,72	2,76	4,61	1,038
L5 ...	10	16,33	2,11	2,12	7,73	1,028
L6 ...		10,46	2,93	2,92	3,57	1,006
L8 ...	10	14,00	2,075	2,11	6,74	1,054
C3 ...	19,5	5,65	2,18	2,10	2,59	0,96
C4 ...	29,5	4,58	1,77	1,75	2,59	1,08
C5 ...	46	5,774	2,28	2,30	2,53	1,03
M1 ...	42,5	10,14	2,93	2,93	3,46	1,01
M2 ...	31	14,24	2,48	2,49	5,73	1,045
M4 ...	36	15,61	3,02	3,01	5,17	1,108
M5 ...	21	7,54	2,84	2,88	2,65	1,046
M6 ...	33,5	15,87	2,25	2,29	7,06	1,103
M7 ...	43	15,57	5,46	5,40	2,85	0,991
M8 ...		8,65	2,44	2,42	3,54	1,005
M9 ...	38,5	12,02	2,10	2,12	5,72	1,091
H1 ...	60,5	11,71	2,238	2,172	5,234	0,967
H3 ...	85	11,41	3,12	3,18	3,65	1,069
H5 ...	33,5	19,36	2,88	2,84	6,71	0,97
H9 ...	26,5	23,09	2,82	2,85	8,18	1,03
H10 ..	73,5	14,42	2,035	2,050	7,086	1,086
H11 ..	50,5	21,66	2,33	2,33	9,28	1,01
H12 ..	56	8,72	2,707	2,78	3,22	1,013
H6 ...	74	11,35	2,075	2,091	5,47	1,026

Tableau 3 - Variabilité intra-ruches parmi des hybrides de phénotypes distincts.

Echantillons		V_M HOFSTEE	Km HOFSTEE	Km HILL	$\frac{V_M}{Km}$	n HILL
H1 global	27/6	11,71	2,24	2,17	5,23	0,967
H1 type L	27/6	6,77	2,48	2,46	2,73	1,016
H1 type L	3/7	13,14	3,89	3,92	3,37	1,02
H1 type C	3/7	14,18	3,63	3,64	3,90	1,006
H5 type L		18,82	2,79	2,77	6,75	0,989
H5 type C		19,90	2,99	2,92	6,65	0,952
H10 global		14,42	2,03	2,05	7,09	1,086
H10 type C		16,36	2,34	2,32	6,99	0,977

c) L'activité des tréhalases et saccharases spécifiques a été déterminée dans le plus grand nombre de cas possibles afin de rechercher les corrélations éventuelles avec les cinétiques α-glucosidasiques observées en présence de substrat artificiel. Des résultats partiels sont résumés dans le tableau 4.

Les formes moléculaires des 3 types d'activités osidasiques ont été comparées après séparation sur gel d'acrylamide 7,5 % à pH 8,6, découpage des gels en sections de 2 mm et incubation dans les mêmes substrats que ceux utilisés pour les mesures cinétiques .

La figure 4 illustre quelques uns des principaux résultats obtenus au cours des recherches sur l'inductibilité des osidases (Chap.IV)

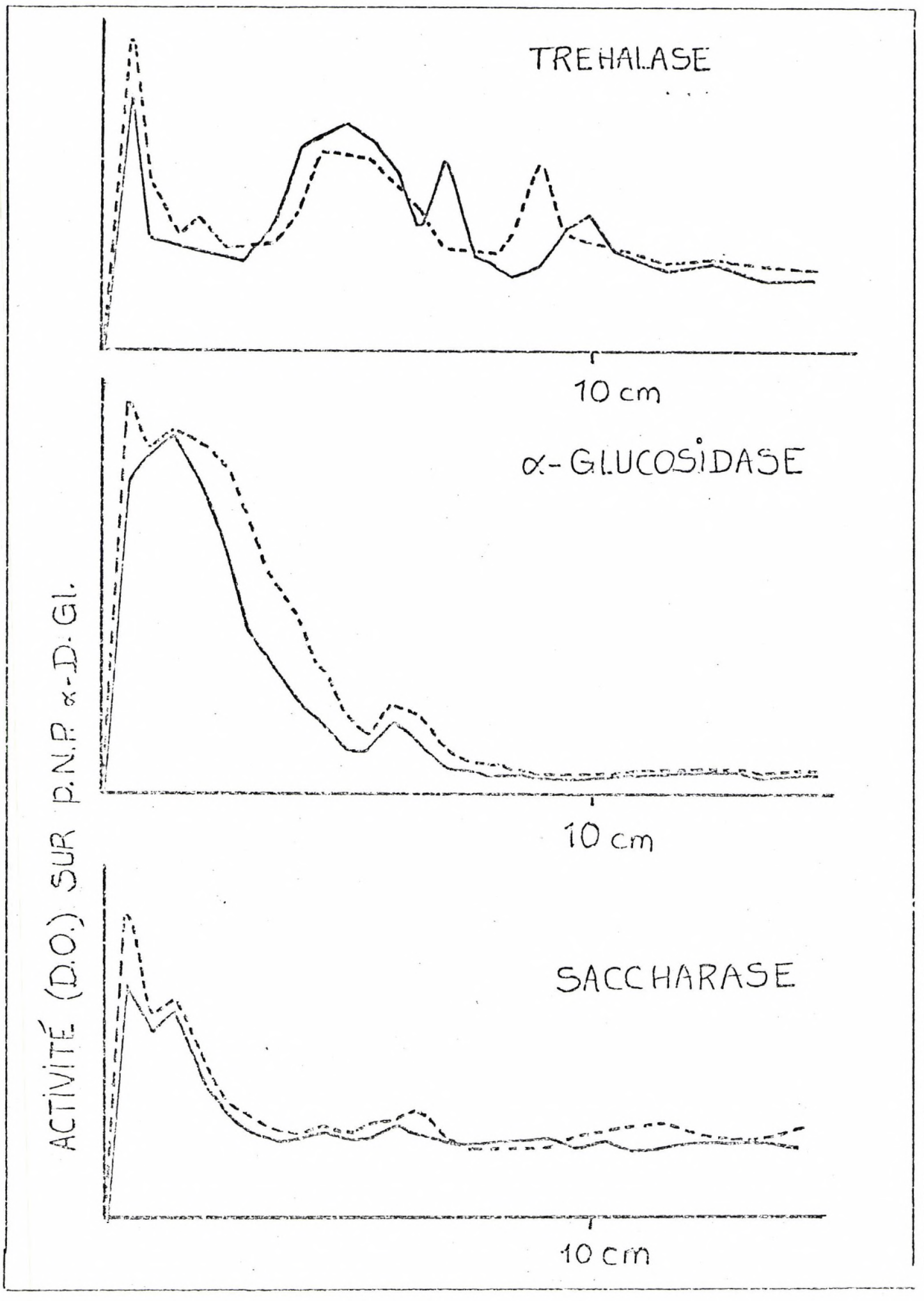


Figure 4 - Comparaison des formes moléculaires des α-glucosidases, tréhalases et saccharases séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide 7,5 % à pH 8,6 à partir de l'hémolymphe de jeunes Abeilles (5 jours) nourries sur tréhalose avec (——) ou sans (---) inhibiteur de la synthèse protéique.

Tableau 4 - Activité des tréhalases et saccharases spécifiques chez les diverses races et hybrides étudiées.

Colonies	Saccharase	Tréhalase
Lo ...	29,075	26,217
L2 ...	78,313	86,967
L3 ...	84,344	50,598
L4 ...	73,161	71,322
L5 ...	35,786	30,869
L6 ...	41,438	73,983
L8 ...	42,114	66,006
—		
M1 ...	91,942	77,571
M2 ...	15,121	49,412
M4 ...	32,054	22,923
M5 ...	74,382	50,886
M6 ...	64,532	52,295
M7 ...	85,962	92,053
M8 ...	67,543	97,270
M9 ...	17,605	28,347

Colonies	Saccharase	Tréhalase
C3 ...	58,934	37,389
C4 ...	78,062	77,851
C5 ...	83,487	104,361
—		
H1 ...	48,134	66,860
H3 ...	16,326	47,506
H5 ...	22,687	23,538
H6 ...	94,092	86,253
H9 ...	33,331	107,880
H10 ..	60,847	64,047
H11 ..	89,724	91,079
H12 ..	75,313	79,698
—		

d) Dans chaque cas les intestins ont été prélevés et placés au congélateur sous une couche de décane, en vue de l'étude ultérieure des phosphatases alcalines. Le principal obstacle à l'aboutissement de cette partie du travail réside dans l'absence de toute sécurité dans l'alimentation électrique du laboratoire, et aux multiples coupures dues à une installation déficiente.

e) Discussion.

L'étude des corrélations entre les diverses osidases d'une part, la glycémie d'autre part, et en dernier lieu la productivité, nécessitera un travail assez long. Comme le montreront les résultats exposés

au Chapitre IV, il existe de réelles parentés entre les formes moléculaires respectives des α-glucosidases, tréhalases et saccharases, mais aussi des différences qui méritent une attention particulière.

Parmi les développements à prévoir pour ce type de Recherche, il est nécessaire d'inclure d'ores et déjà la purification et l'étude des propriétés cinétiques particulières de chaque forme, ce qui constitue — les spécialistes le savent bien — un projet déjà lourd par lui-même, en particulier dans l'optique de conserver intactes les propriétés des mécanismes moléculaires mis en évidence.

Une autre nécessité apparaît également : celle d'approfondir l'étude des osidases spécifiques naturelles (tréhalase, saccharase) par l'analyse cinétique en continu, seule capable d'aboutir aux déterminations les plus précises des paramètres V_M, K et n. Actuellement, seule la micropolarimétrie quantitative (avec enregistreur) peut offrir de telles possibilités, d'où la demande effectuée dans le cadre de l'ATP " méthodologie biochimique en Agronomie ".

Chapitre IV - L'INDUCTIBILITE DE L'ACTIVITE DES α-GLUCOSIDASES.

(M. BOUNIAS et M.R.J. MORGAN)

Ce chapitre recouvre une expérimentation d'assez vaste envergure, dont la réalisation expérimentale n'a été possible, en quelques mois seulement, que grâce aux efforts d'une équipe très " chevronnée " bénéficiant de la préparation méthodologique parfaitement au point du Laboratoire de Biochimie.

L'ensemble des travaux peut se résumer ainsi :

1º Induction à " court terme ".

Injection de tréhalose avec et sans inhibiteur de synthèse protéique. Etude de la glycémie, des α-glucosidases, des tréhalases et des saccharases au bout de 1 à 16 H après administration du substrat.
Complément : étude des effets directs de l'inhibiteur (chloramphénicol) sur les paramètres cinétiques des α-glucosidases.

2º Induction à " long terme ".

Administration " per os " de tréhalose et de saccharose, avec et sans inhibiteur de la synthèse protéique, à des Abeilles naissantes élevées en conditions artificielles.

Etude sur une durée de 24 heures à 16 jours des paramètres suivants :

- glycémie (importantes modifications qualitatives et quantitatives)
- α-glucosidases - tréhalases - saccharases : paramètres cinétiques et formes moléculaires.
- protéines de l'hémolymphe : étude quantitative de l'évolution du spectre en l'absence et en présence d'inhibiteur.
- observation du comportement des individus et de leur mortalité. Etude biochimique de l'agonie et de la mort.

Complément : action directe du tréhalose et du saccharose sur les paramètres cinétiques des α-glucosidases " in vitro ".

3º Méthodologies.

- Les analyses de glycémie ont été réalisées au moyen d'une nouvelle technique (publiée dans Analytical Biochemistry) mise au point au laboratoire au cours des années précédentes (cf. Chap. V).

— L'étude des activités enzymatiques a été opérée sous deux angles complémentaires :

. Substrat artificiel : α-glucosidases, selon les techniques cinétiques " en continu " développées au Laboratoire de Biochimie.

. Substrats naturels : tréhalases et saccharases, selon les techniques de détermination d'activités développées par le DR. MORGAN (fig. 4).

— L'étude des paramètres cinétiques des α-glucosidases a été réalisée en premier lieu par le DR. MORGAN d'après les représentations mathématiques approchées de HOFSTEE/AUGUSTINSSON et de HILL. Elle sera poursuivie et précisée au cours des mois à venir d'après la méthode algébrique " rigoureuse " de BOUNIAS (en particulier, analyse plus approfondie des variations du coefficient de HILL).

— Le spectre protéique quantitatif a été déterminé par électrophorèse en gel d'acrylamide et photométrie (fig. 5).

4º Résultats numériques.

— Les résultats, encore incomplètement dépouillés, sont illustrés par la série suivante de tableaux numériques, ainsi que par les figures 4 et 5.

Tableaux 5 à 10 : Induction à court terme.

Tableau 5 - Injection de tréhalose : 5 µl de solution 1 M par Abeille, T = sans inhibiteur ; I = avec chloramphénicol (2 % dans le tréhalose).

Temps après injection		V_M HOFSTEE / AUGUSTINSSON	V_M	Km	Km	K HILL	n
0		16,15	16,78	3,24	3,013	3,03	1,027
2 H	T	8,78	9,26	2,20	2,46	2,23	1,052
	i	14,25	—	3,17	—	3,19	1,029
4 H	T	8,99	9,41	2,94	3,22	2,98	1,028
	i	11,6	—	2,65	—	2,57	0,970
6 H	T	17,33	16,88	2,23	2,12	2,22	1,005
	i	11,23	—	2,50	—	2,48	0,992
8 H	T	12,65	12,90	2,28	2,40	2,31	1,05
	i	13,80	—	2,36	—	2,39	1,047
16 H	T	13,57	13,81	3,44	3,56	3,47	1,025
	i	7,58	—	2,37	—	2,41	1,067

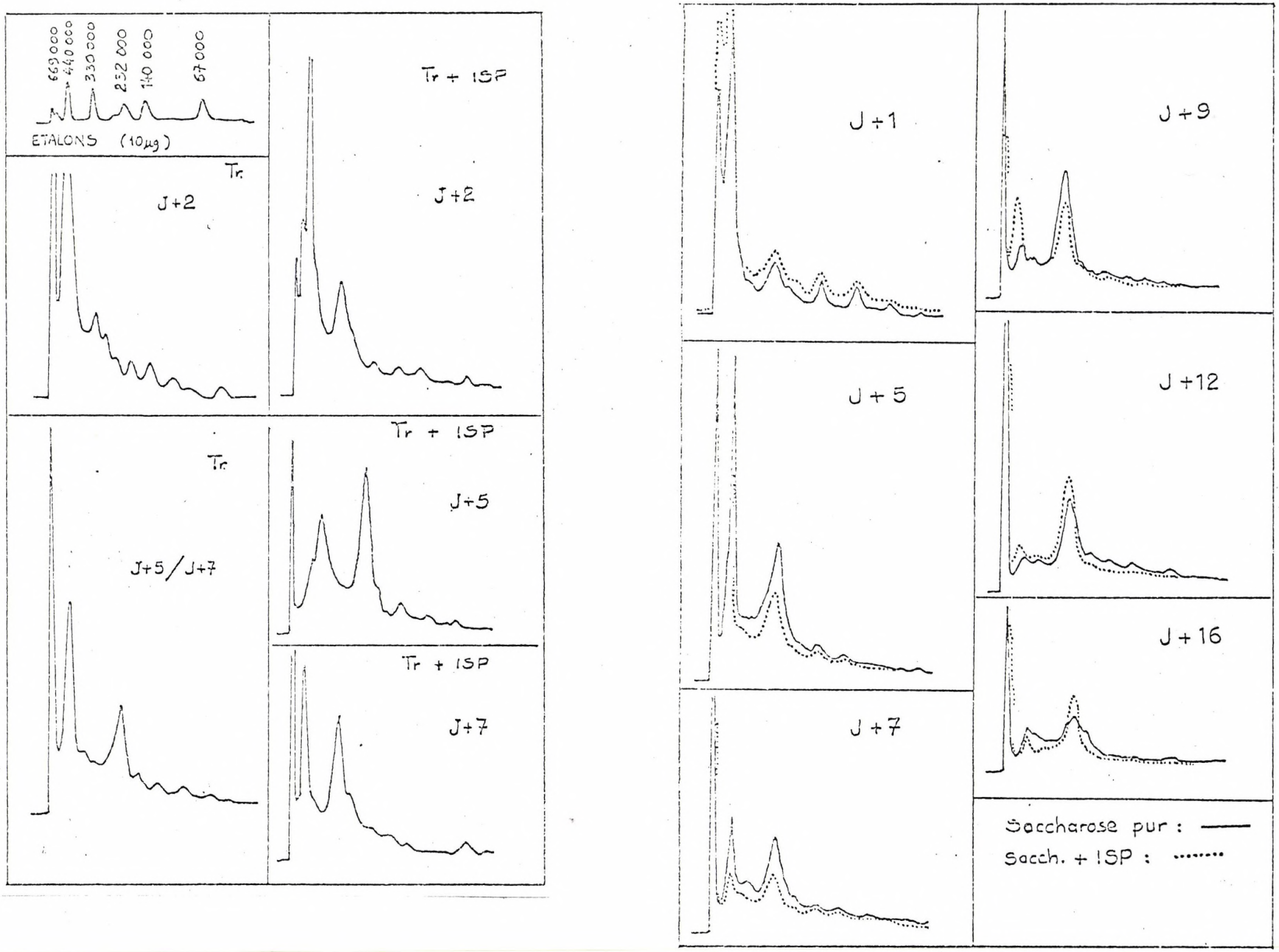


Figure 5 - Evolution, en fonction du temps, du spectre protéique de l'hémolymphe d'Abeilles nourries sur tréhalose (T) et sur saccharose (S) en présence (·····) ou en l'absence (——) d'inhibiteur de synthèse protéique.

Tableau 6 - Variations de la vitesse de réaction (v_i) en fonction de la concentration de l'enzyme (E) chez l'Abeille naissante.

15-6-79	E (µl)	2	4	5*	8	16
	vi	1,098	1,791	2,190	3,789	6,360
S = 1 mM	régression vi/E : ρ = 0,995 pente b = 0,382 ord. à l'origine a = 0,375					
5-7-79	E	1	2	3	4	5
S = 0,2 mM	vi	1,023	2,011	2,821	3,409	4,500
	ρ = 0,996 b = 0,835 a = 0,247					
6-7-79	E	0,2	0,5	1	2	5
S = 1 mM	vi	12,748	29,412	48,914	70,312	144,00
	ρ = 0,994 b = 26,097 a = 15,668					

Observations :

Linéarité suffisante pour justifier l'emploi des équations valables dans les conditions d'équilibre dites " Steady State " mais légère courbure nécessitant une étude particulière.

Tableau 7 - Paramètres témoins et action de la température sur la vitesse de réaction (15-6-79).

pour S = 0,2 mM	TºC	25,5	27	31
	vi	0,415	0,667	0,556
HOFSTEE-PLOT :	V_M = 9,355	Km = 3,21		
HILL-PLOT :	—	K = 3,197	n = 0,999	

Tableau 8 - Action du chloramphénicol (I) sur les paramètres cinétiques α-glucosidasiques in vitro.

V = f(I)						
[Chlrmph] g/l	0	0,26	0,52	1,04	2,08	5,21
vi µM/mn/µl	2,190	2,432	2,022	2,113	1,776	1,272

V = f(S)	HOFSTEE/AUGUSTINSSON			HILL	
	V_M	Km	V_M/Km	Km	n
I = 0,0087	11,270	3,866	2,915	3,783	0,973
I = 2,083	7,009	2,932	2,391	2,891	0,984

Tableau 9 - Influence de la conservation des extraits pendant 36 H à la température comprise entre 0 et 4ºC.

V = f(S)	HOFSTEE/AUGUSTINSSON			HILL	
	V_M	Km	V_M / Km	Km	n
Témoin (To)	15,57	5,459	2,85	5,396	0,991
To + 36 H	12,247	3,484	3,515	3,530	1,036

Tableau 10 - Action du tréhalose in vitro sur les cinétiques α-glucosidasiques. (mécanisme apparent : incompétitif)

V = f(S)	HOFSTEE/AUGUSTINSSON			HILL	
	V_M	Km	V_M / Km	Km	n
Témoin	11,223	2,867	3,915	N.Y.D.	N.Y.D.
[Tréhalose] = 125mM	9,451	2,498	3,783	N.Y.D.	N.Y.D.

Estimation de Ki :

d'après Km Ki = 844,6 mM
d'après V_M Ki = 666,7 mM

Tableaux 11 à 13 : Induction à long terme
Action du tréhalose et du saccharose " per os ".

Tableau 11 - Consommation de solutions nutritives et mortalités dans les conditions observées, soit :

	Saccharose 2M	Tréhalose 1M	Chloramphénicol 0,05%
A	+	-	-
B	+	-	+
C	-	+	-
D	-	+	+

Consommation Temps :	A	B	C	D
Jour J	0,0 ml	0,0 ml	0,0 ml	0,0 ml
J + 2	0,8	1,0	1,0	1,0
J + 5	3,0	4,2	2,9	2,6
J + 7	—	—	3,3	—
J + 9	5,3	7,2	3,6	3,8
J + 12	6,4	—	4	4,1
J + 14	7,2	9,6	—	—
J + 16	7,7	10,1	7,4	—
Mortalité				
5-7	0	0	4	0
6-7	2	0	13	10
9-7	0	0	9	9
10-7	0	0	4	0
11-7	0	1	2	4
12-7	1	0	0	0
13-7	2	0	1	3
16-7	3	0	fin	1
18-7	1	0	—	—
20-7	4	0	—	—

Tableau 12 - Variation des paramètres cinétiques en fonction du temps dans les cas A et B (résultats partiels).
M = mortalités cumulées, E = concentration enzymatique.

Temps	E µl	HOFSTEE/AUGUSTINSSON			HILL	
		V_M	Km	V_M / Km	K	n
Témoin	5	7,529	3,222	2,337	3,144	0,972
J + 1 (A ...	5	26,559	3,408	7,792	3,407	1,002
J + 1 (B ...		31,393	4,993	6,288	4,953	0,990
J + 2 (A ...	2	64,777	2,936	22,061	2,889	1,024
J + 2 (B ...		60,419	3,673	16,449	3,625	0,993
J + 5 (A ...	1	105,517	3,961	26,642	3,914	0,989
J + 5 (B ...		90,545	4,839	18,711	4,927	1,049
J + 7 (A ...	0,5	122,495	3,973	30,835	3,863	0,973
J + 7 (B ...		90,151	3,609	24,978	3,595	1,000
J + 9 (A ...	1	63,615	4,009	15,867	3,915	0,974
J + 9 (B ...		45,323	5,183	8,744	5,244	1,043
J + 12 (A ..	1	98,108	3,561	27,552	3,534	0,994
J + 12 (B ..		51,493	3,848	13,381	3,867	1,011
J + 14 (A ..	0,5	314,304	3,655	85,984	3,692	1,024
J + 14 (B ..		75,99	4,349	17,472	4,347	1,002

Tableau 13 - Variations des paramètres cinétiques en fonction du temps dans les cas C et D.

Temps	E µl	HOFSTEE/AUGUSTINSSON			HILL		M
		V_M	Km	V_M / Km	K	n	
J + 1 (C	5	59,208	2,958	20,016	2,912	0,981	0
J + 1 (D	5	56,594	4,644	12,186	4,712	1,038	0
J + 2 (C	1	182,977	2,599	70,411	2,640	1,074	13
J + 2 (D	2	131,752	3,877	33,979	3,864	0,998	10
J + 5 (C	1	280,923	2,617	107,332	2,622	1,009	22
J + 5 (D	1	237,307	4,435	53,509	4,424	1,005	19
J + 7 (C	0,5	182,904	3,030	60,359	3,066	1,03	26
J + 7 (D	0,5	176,206	4,221	41,748	4,252	1,017	23
J + 9 (C	1	172,184	2,648	65,036	2,560	1,006	27
J + 9 (D	1	189,440	3,777	50,160	3,764	1,004	26
J + 12 (C	—	fin	—	—	—	—	
J + 12 (D	0,5	160,454	3,951	40,616	3,934	0,997	27

Tableaux 14 à 18 : Tréhalases et Saccharases spécifiques.

Tableau 14 - Etude des Tréhalases et des Saccharases spécifiques : étalonnage du réactif.

CALIBRATION CURVE FOR GLUCOSE REAGENT (3-7-79)

(Glc)	ln(Glc)	Chart Paper Reading	ln(Reading)	Absorbance	ln(Absorbance)
0·0	–	0	–	·000	–
0·2	-1·609	8	2·079	·067	- 2·703
0·4	-0·916	19·5	2·970	·163	- 1·814
0·6	-0·511	31	3·434	·258	- 1·355
0·8	-0·223	49·5	3·902	·413	- 0·884
1·0	0·000	66	4·190	·550	- 0·598
1·0 *		66·5		·554	
mM		mm			

Linear Regression of ln(Reading) on ln (Glc) :-
r = ·999
Slope = 1·308 (= 1/·76453) ∴ Glc = $\left(\frac{mm}{64.586}\right)^{·76453}$
Intcp = 4·168 (= ln 64·586)

P.T.O.

Calculation of Factor x → Activity in E.U. l^{-1} haemolymph

SUCRASE Determination :-
E = 5µl Haemolymph + 20µl H_2O ; S = 25µl 40mM Sucrose
V = 50µl ; t = 60 min; (S) = 20mM ≃ 5·Km ; T = 37°C
∴ Factor x = $\frac{1000 \times 50}{60 \times 5}$ = 166·667 (17,19-7-79)

(for 20-7-79 E = ·5µl Haemolymph & x = 1666·67)

M750
HIVE Temperature
T = 34°C

Whole 50µl + 200µl GR → 60min @ 37°C

TREHALASE Determination :-
E = 2·5 µl Haemolymph + 22·5µl H_2O ; S = 25µl 8 mM Trehalose
V = 50µl ; t = 60 min ; (S) = 4mM ≃ 5·Km ; T = 37°C
∴ Factor x = $\frac{1000 \times 50}{60 \times 2.5 \times 2}$ = 166·667 (18,19-7-79)

(for 23-7-79 E = ·25µl Haemolymph & x = 1666·67)

Tableau 15 - Courbes cinétiques V = f(t) et courbes de saturation Vo = f(S) dans le cas des Tréhalases et Saccharases spécifiques.

PROGRESS CURVES for HAEMOLYMPH SUCRASE & TREHALASE (M750)

* Corresp to Haemolymph [Glc] = 6·15 mM

P.T.O. (4-7-79)

t	SUCRASE Reading	SUCRASE [Glc]	TREHALASE Reading	TREHALASE [Glc]	Reading	[Glc]
0	26	·410*	(60)	(·777)	00	·000
5	27·5	·428	75·5	·926	11	·560
10	30·5	·463	86·5	1·027	20	·884
15	35·5	·520	(80·5)	–	23	·984
20	38·5	·553	(10)	–	–	–
30	62·5	·801	111	1·243	32	1·266
45	71	·883	137	1·460	45	1·643
60	82	·986	152	1·581	55	1·916
min	mm	mM	mm	mM	mm	mM
1mM → GLC STD	83·5 SCALE x2	1·0 ZERO ON (FOR ASSAY OF BUFFER CTRL)	83·5 SCALE x2	1·0 ZERO ON (GR ASSAY OF BUFF CONTROLS)	23·5 SCALE x2	1·0 ZERO ON t = 0
Formula	[Glc] = $\left(\frac{Reading}{83.5}\right)^{·76453}$				[Glc] = $\left(\frac{Reading}{23.5}\right)^{·76453}$	

EFFECT of [S] for HAEMOLYMPH SUCRASE & TREHALASE (M750) – RANGE-FINDING RUN (10-7-79)

P.T.O.

ENZYME H_2O	ENZYME Haemolymph	BUFFER-SUBSTRATE B	BUFFER-SUBSTRATE $S_{(40mM)}$	[S]	SUCRASE Reading	SUCRASE [Glc]	TREHALASE Reading	TREHALASE [Glc]
10	5	35	0	0	19	·438*	19	·438*
10	5	30	5	4	29	·605	63·5	1·101
10	5	25	10	8	38	·743	68·5	1·167
10	5	20	15	12	43·5	·824	61	1·068
10	5	15	20	16	40	·773	61·5	1·074
10	5	10	25	20	47·5	·882	76·5	1·269
10	5	5	30	24	38	·743	70	1·186
10	5	0	35	28	43	·817	68	1·160
µl	µl	µl	µl	mM	mm	mM	mm	mM

TOTAL Volume = 50 µl ;
t = 60 min; T = 37°;
+ 200 µl GR (60 min @37)

STANDARDS/CONTROLS:-
B 00 S 00
G 55 STD T 00

* Corresponds to Haemolymph [Glc] level 4·38mM

Tableau 16 - Première estimation des paramètres (HOFSTEE).

	V_M	Km	V_M/Km
Tréhalase	0,957	0,756	1,267
Saccharase	0,205	4,105	0,050

Tableau 17 - Activité des Saccharases et Tréhalases après injection de tréhalose (Tr) avec ou sans chloramphénicol (i).

Temps	Tréhalase		Saccharase	
	Tr	Tr + i	Tr	Tr + i
2 H ..	97,874	96,498	175,689	56,186
4 H ..	120,319	98,392	115,167	58,860
6 H ..	148,846	110,411	80,387	124,676
8 H ..	115,422	130,767	86,667	79,191
16 H .	92,087	140,083	53,898	107,480

Tableau 18 - Activité des Saccharases (1) et Tréhalases (2) dans le cas d'inductions à long terme par le saccharose et le tréhalose " per os ".
Les cas A, B, C, D sont désignés comme au tableau 9.

20-7-79		A	B	C	D
Temps (jours)					
1	(1)	724,511	829,918	1336,006	1252,114
	(2)	480,937	339,465	513,577	513,577
2	(1)	1295,668	507,411	896,848	823,632
	(2)	516,121	522,266	534,872	436,876
5	(1)	208,721	178,448	1530,288	2071,406
	(2)	31,792	286,738	112,278	109,530
7	(1)	1527,399	1527,399	2087,588	2048,198
	(2)	135,147	77,075	90,964	321,750
9	(1)	1671,122	1671,122	1379,208	2042,466
	(2)	275,941	174,192	317,362	433,363
12	(1)	1778,187	1778,187	—	1717,491
	(2)	132,392	60,388	—	242,960
14	(1)	2063,304	2063,304	—	—
	(2)	83,041	135,147	—	—
16	(1)	2204,051	2204,051	—	—
	(2)	270,941	142,154	—	—

5º Discussion.

Bien que partiellement dépouillés, seulement, les résultats montrent déjà une inductibilité des osidases par le tréhalose et le saccharose.

Ce phénomène d'induction est réduit par l'adjonction du chloramphénicol, inhibiteur de la synthèse protéique (comme le confirme la comparaison des spectres protéiques). Il paraît donc s'agir d'une véritable induction de la synthèse d'enzyme.

L'étude de l'évolution de la glycémie, dans le même temps, a montré de surprenant résultats, avec en particulier l'apparition au bout de plusieurs jours, de polyholosides nouveaux absents à l'état naturel dans les conditions de vie dans la ruche.

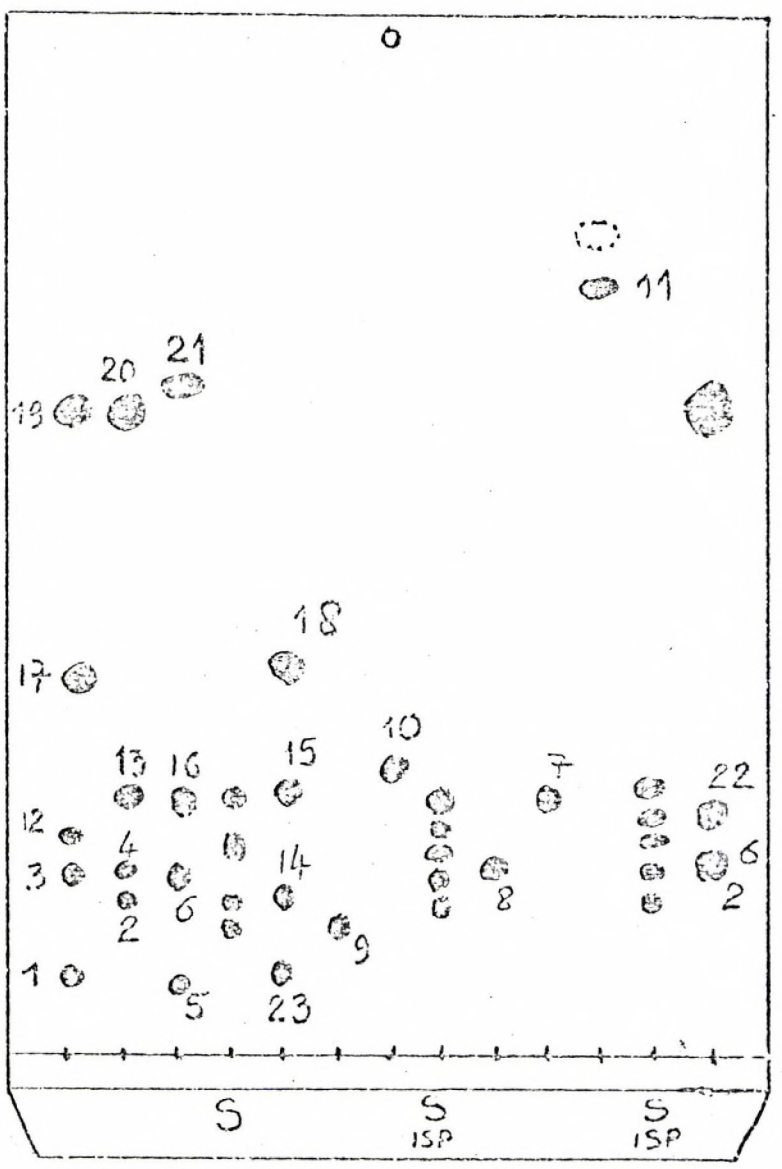
Partant de l'hypothèse que des α di-glucosides et fructo-glucosides pourraient reformer d'autres polyholosides constitués de liaisons α, et de " noyaux " glucose et fructose, nous avons opéré une série de chromatographies dans divers systèmes éluants, en présence d'une large gamme d'étalons (figure 6) comprenant :

1 Raffinose	6 Maltose	12 Glucose	19 Rhamnose
2 Mélézitose	7 Turanose	13 Fructose	20 Désoxy-glucose
—	8 Palatinose	14 Galactose	21 Désoxy-ribose
2 Cellobiose	9 Lactose	15 Mannose	22 Saccharose
4 Tréhalose	10 Sorbose	16 Arabinose	23 Gentiobiose.
5 Mélibiose	11 Digitoxose	17 Ribose	

(Nous n'avons pu obtenir des fournisseurs, pour l'instant, ni l'isomaltose ni l'erlose).

Un long travail d'identification et de dosage de chaque composant est en cours dans les extraits d'Abeilles nourries dans les conditions A, B, C et D.

Figure 6 - Etude chromatographique des composants glycémiques induits par nourrissement sur saccharose avec ou sans inhibiteur de synthèse protéique (ISP). La numérotation des étalons est détaillée dans le texte.



Chapitre V - ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES GLUCIDES A L'ECHELLE DE LA PICOMOLE.

(M. BOUNIAS)

1º Introduction.

La découverte au Laboratoire de Biochimie du N(Naphtyl-1) éthylène diamine, dichlorhydrate comme réactif des glucides remonte à 1974 (cf. Rapport d'Activité 1er semestre 1975). Toutefois l'étude approfondie des propriétés de ce nouveau réactif n'a été développée qu'au cours des dernières années, et son utilisation au laboratoire est devenue systématique depuis 1978.

L'emploi de ce réactif, conjugué avec l'utilisation d'une méthode mathématique transformant toutes les formes de courbes d'étalonnage en droites passant par l'origine, par le biais d'un " coefficient d'expansion linéaire " (x) spécifique de chaque molécule glucidique.

Le coefficient (x) et la pente d'étalonnage (p) permettent de relier les surfaces des pics (après enregistrements) aux quantités déposées (C) selon la relation :

$$S^x = p\,C$$

(*)

Une étude publiée dans " Analytical Biochemistry " fait ressortir les éléments suivants.

2º Méthode de dosage.

Le coefficient x est déterminé d'après le calcul de régression de $Log._n$ C sur $Log._n$ S. La pente p est déterminée avec davantage de précision d'après la régression de S^x sur C, d'après laquelle sont tirées les valeurs à doser Ci par introduction dans l'équation des surfaces correspondantes Si. La figure 7 illustre les étapes de la méthode dans deux cas particuliers.

3º Structure du réactif.

Formule brute : $C_{12}\,H_{16}\,N_2\,Cl_2$.

Masse molaire des préparations commerciales :

- Merck nº 6237, MM = 259,18
- Baker Analyzed Reagent nº 1341) MM = 291,22
- Carlo Erba nº 463831/463833) ($C_{10}H_7$, C_2H_4, N_2, H_5, Cl_2, CH_3OH)

(*) Vol. 106, 1980, 6 pages.

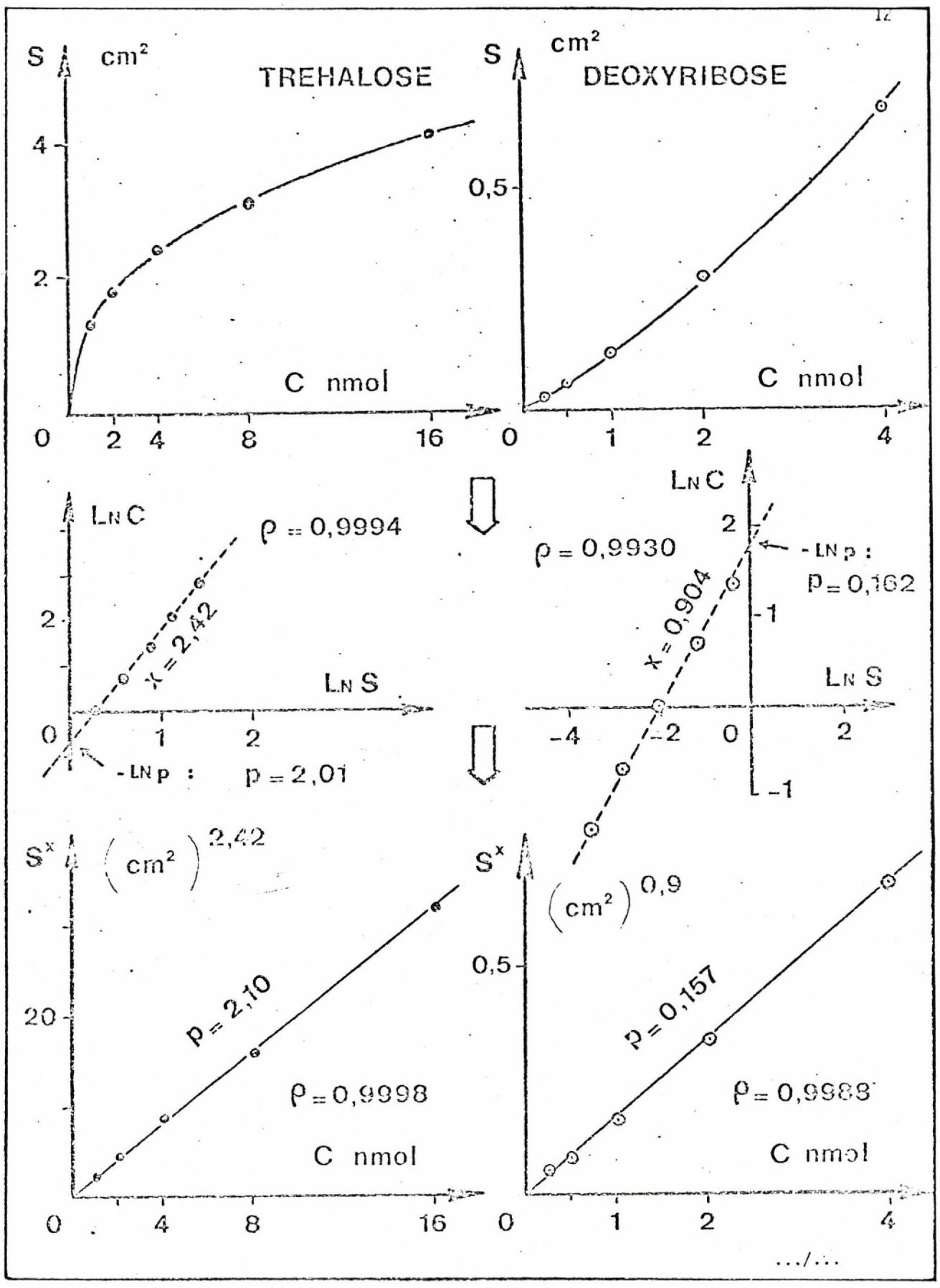
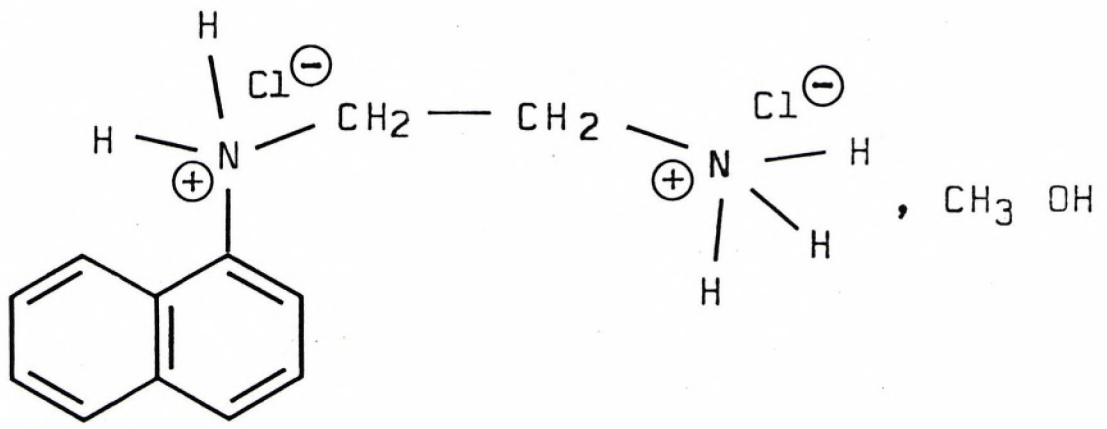


Figure 7 - Les 3 étapes du calcul d'étalonnage chromatographique par la technique du coefficient d'expansion linéaire, appliquées à deux cas concrets.

Formule spatiale :



Abréviation utilisée au Laboratoire de Biochimie : NEDiAC.

(** Je persiste à ne pas employer d'unités – daltons ou autres – car les masses molaires sont des rapports relatifs à la masse de l'hydrogène ou de l'oxygène, donc grandeurs sans " dimensions ", opinion entièrement partagée par le DR. MORGAN).

4º Résultats qualitatifs.

Le NEDiAC colore les glucides sur fond blanc, ce qui constitue actuellement un avantage sans équivalent, pour l'analyse photométrique quantitative.

Les colorations observées pour différents glucides, ainsi que le temps nécessaire à leur apparition, sont résumés dans le tableau 19.

Les différences de coloration du glucose et du fructose s'accentuent temporairement avec la durée de conservation des plaques : elles ont permis de caractériser la présence ou l'absence de fructose dans certains diholosides, en particulier dans l'identification des polyholosides nouveaux apparus lors du nourrissement sur tréhalose et saccharose (cf. Chap. IV).

5º Résultats quantitatifs : paramètres d'étalonnage.

Le tableau 20 présente les paramètres x et p (de l'équation $S^x = p.C$) ainsi que l'ordre de grandeur des limites de sensibilité en pico-moles (10^{-12} moles) pour diverses catégories de glucides. La sensibilité est environ 50 fois supérieure à celle des autres méthodes, et la précision relative finale, dans un domaine de 0,06 à 80 nanomoles varie de 0,2 à 6 %.

6º Corrélations structurales moléculaires.

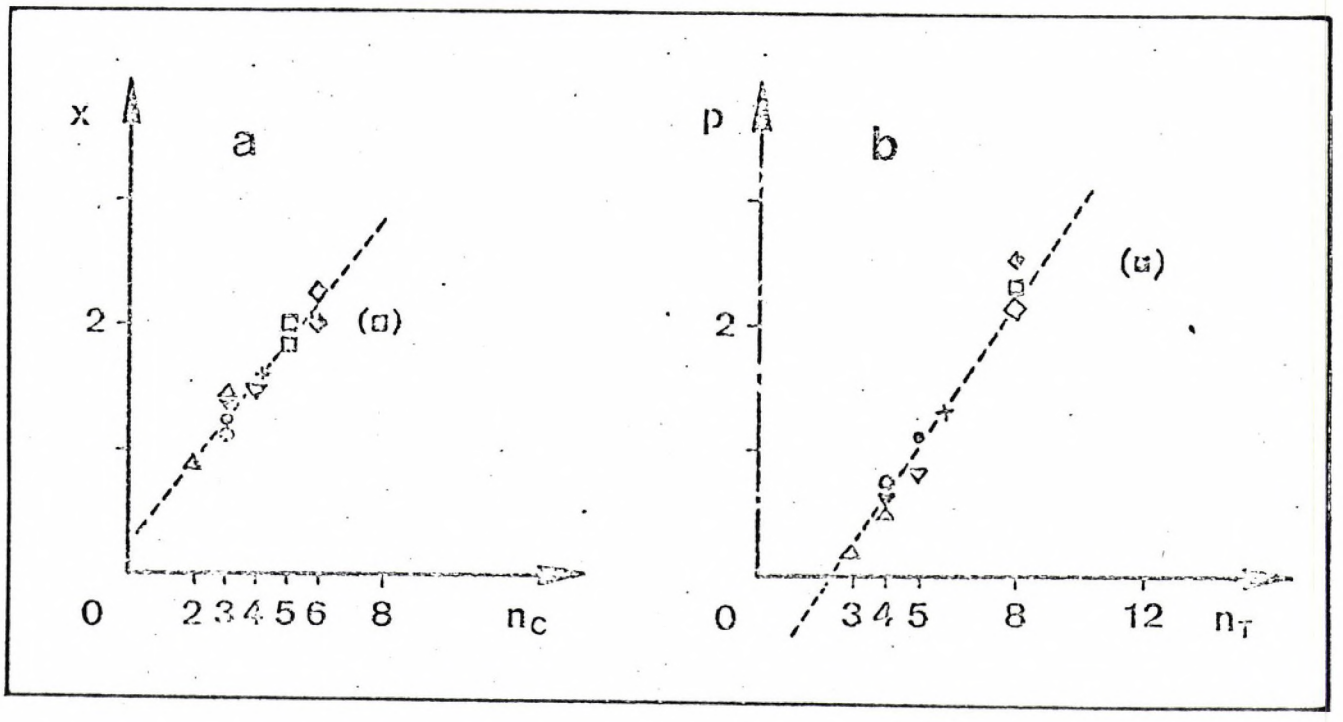
Les paramètres (x) et (p) sont en corrélation étroite avec le nombre de groupements hydroxyles présents sur les molécules glucidiques, comme l'indique la figure 8.

Tableau 19 - Colorations des glucides sur plaques de gel de silice après pulvérisation au N (1-naphtyl) éthylène diammonium dichloride, suivie de chauffage à 100 ºC.

glucides	temps avant apparition des colorations	coloration après 4 mn
Désoxy-glucose	40 s	gris-bleu
Désoxy-ribose	50 s	gris-mauve
Sucrose et Mélézitose	1 mn 20 s	violet
Fructose	1 mn à 1 mn 30 s	rouge-violet
Maltose et Tréhalose	1 mn 15 s à 1 mn 45 s	violet
Ribose	1 mn 35 s à 1 mn 50 s	bleu à gris-vert
Rhamnose	1 mn 30 s à 2 mn	rouge carmin
Glucose	1 mn 40 s à 3 mn	gris-violet
Ascorbic acid	2 mn à 3 mn	marron-rouge

Figure 8 - Corrélations entre les paramètres de réaction du N-(naphtyl-1) éthylène-diammonium dichlorhydrate avec les glucides et leur structure moléculaire.

x = coefficient d'expansion linéaire, p = pente d'étalonnage,
n_C = nombre de radicaux hydroxyles rattachés au cycle,
n_T = nombre total de radicaux hydroxyles.



Ces propriétés peuvent être appliquées à l'étude de la structure moléculaire des glucides par chromatographie en couche mince.

7º Développements et projets.

Depuis 15 ans, des méthodes quantitatives d'analyse chromatographique ont été mises au point, créées ou adaptées aux plaques préfabriquées sur supports souples, dans le cas de très nombreux composants biochimiques (d'où la rédaction d'un ouvrage qui sera, en principe, terminé au cours du 1er semestre 1980 : cf. Chap. VIII).

Actuellement, le facteur limitant réside dans les performances (et l'usure) du photomètre, et ce décalage va s'aggraver au cours des années à venir. Il serait donc indispensable de prévoir son remplacement par un appareil dont les possibilités seraient davantage en rapport avec les techniques chromatographiques développées au Laboratoire de Biochimie (ZEISS KM3).

Tableau 20 - Comparaison des paramètres d'étalonnage et des limites de sensibilité de dix glucides. Ces données ont été obtenues à partir de la gamme suivante d'étalons, déposés sur couches de silice : 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 4 et 8 nanomoles.
Les écarts-types (σ) sont donnés entre parenthèses d'après 3 mesures.

glucides	Regression LN(C)/LN(S) Correl.	pente(x)	σ	Regression $(S)^x/(C)$ Correl.	pente(p)	σ	limite de sensibilité (nmole)
Mélézitose ...	0,9992	2,00	(0,034)	0,9999	2,53	(0,099)	0,010
Maltose	0,9996	1,98	(0,001)	0,9998	2,46	(0,045)	0,02
Tréhalose	0,9994	2,26	(0,246)	0,9998	2,16	(0,281)	0,02
Sucrose	0,9986	2,03	(0,134)	0,9994	2,25	(0,250)	0,015
Glucose	0,9996	1,43	(0,052)	0,9997	0,80	(0,008)	0,04
Fructose	0,9997	1,27	(0,001)	0,9998	1,11	(0,006)	0,03
Ribose	0,9999	1,34	(0,001)	0,9999	0,54	(0,003)	0,05
Rhamnose	0,9981	1,34	(0,225)	0,9975	0,74	(0,031)	0,06
Désoxy-glucose	0,9994	1,34	(0,001)	0,9999	0,63	(0,016)	0,06
Désoxy-ribose	0,9993	0,905	(0,001)	0,9991	0,16	(0,002)	0,12

Chapitre VI - LES α-GLUCOSIDASES INTESTINALES DES ONISCOIDES.

Par suite d'une demande de collaboration du Professeur LAGARRIGUES (Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, Université de Montpellier), le Laboratoire de Biochimie a reçu au mois de Mai Monsieur SEVILLA pour un stage de formation d'enzymologie appliquée à l'étude des α-glucosidases digestives de diverses espèces de cloportes (oniscoïdes).

Le pH optimal, déterminé comparativement dans l'intestin et dans le caecum montre une activité de même spectre, avec un maximum en milieu acide. Les premières cinétiques " de saturation " (V/S) ont été effectuées et devraient se poursuivre à Montpellier.

A l'occasion de ce travail, l'étude des paramètres d'étalonnage du para-nitro-phénol dans les conditions d'application observées au Laboratoire de Biochimie a été vérifiée et approfondie.

Ces travaux doivent constituer une partie de la Thèse de Doctorat d'Etat de M. SEVILLA.

Chapitre VII - OUVRAGES.

La rédaction de la monographie sur " l'analyse biochimique quantitative par nano-chromatographie en couche mince sur supports souples ", abordée en 1975 en relation avec les éditions MASSON, a été reprise, pratiquement à plein temps, à partir du 14 novembre. L'achèvement de l'ouvrage (qui pourrait comporter 2 tomes) nécessitera la mise au point finale de plusieurs techniques complémentaires devant figurer au sommaire : ces travaux sont prévus pour le 1er semestre 1980, un délai de rédaction supplémentaire de 2 mois ayant été accordé par les éditeurs.

La rédaction de l'ouvrage " La Biochimie et l'Abeille " est restée en suspens du fait de l'intense activité de recherche et de rédaction de notes originales. Elle sera vraisemblablement reprise en 1981 et bénéficiera, alors, d'importants progrès réalisés dans ce domaine de connaissances scientifiques.

Un manuel d' " Enzymologie cinétique expérimentale " est envisagé. Plusieurs centaines de références originales concernant de récentes méthodes ont été collectées, et les données numériques acquises par le Laboratoire de Biochimie permettront d'offrir une très large gamme d'exemples concrets (prévision : 1982).

COMPTE RENDU
FINANCIER

I - ATTRIBUTIONS POUR 1979.
(par le Département de Zoologie)

- Crédit Equipement : 12.500
- Crédit Fonctionnement : 16.000
- Répartition effective des dépenses :

Budget de Fonctionnement

Désignation	Engagement initial	Chapitre nº	Coût final TTC
Réparations	(2500)	631-2	520,32 F
.....	(1000)	631-5	—
Matériel de laboratoire ..	(3500)	634-1-1	5601,43 F
Produits chimiques	(2500)	634-1-2	3635,51 F
Xérox	(1000)	634-1-3	770,90 F
Fournitures Bureau	(1000)	634-1-4	79,17 F
Documentation (tirages CNRA + ouvrages)	(2500)	634-3	2800,71 F
Affranchissement courrier	(500)	634-4	651,50 F
Déplacements	(1500)	641-1	1350,00 F
Total :	(16000)		15409,54 F

Soit un reliquat de 590,46 F (3,7 % du total) qui compense un léger déficit observé en équipement.

Budget d'Equipement

Désignation	nºinventaire	Coût TTC
Banc Polaroïd MP4 Standard	79/21-291/6A	8106,66 F (+865,33F)
Etuve universelle ventilée inox	79/21-291/71	4720,46 F (+1224,45F)
Total :		12827,12 F

Soit un " découvert " de 327,12 F représentant 2,6 % du montant attribué.

Le bilan général (Equipement + Fonctionnement) se traduit donc en définitive par un déficit de 263,34 F sur un engagement de 28500 F, soit un dépassement de 0,92 %.

II - PREVISIONS POUR 1980.

L'évolution des attributions budgétaires du Laboratoire de Biochimie se résume ainsi pour les 2 années écoulées :

	1978	1979	1980*
Equipement	16000	16000	21000*
Fonctionnement	37000	12500	?
Total	53000	28500	?
Personnels	...	...	1 Sc. + 1 Techn.5B

* Une stagnation en fonctionnement et un net recul (-60%) en équipement se sont fait ressentir en particulier pendant la période d'accueil " Sabbatique " du DR. MORGAN. C'est sans doute pour ces raisons que le Département de Zoologie a décidé en fin d'année de porter le crédit de fonctionnement du Laboratoire de Biochimie à la somme de 21000 F, soit un accroissement de 31 %, offrant des possibilités satisfaisantes.

En équipement, aucune nouvelle concernant l'attribution 1980 n'est encore parvenue.

Les demandes ont été constituées comme suit :

1) Divers compléments optionnels de matériel acquis ..... 4700 F
2) Thermostat à circulation pour enzymologie ..... 8600 F
3) Conductivimètre pour contrôle de l'eau (enzymologie) ..... 5800 F
4) Balance électronique sensible à 0,1 mg ..... 14000 F

33100 F

5) Sur demande de contrat / ATP " Méthodologie Biochimique en Agronomie "

- Micro-polarimètre enregistreur ..... 79000 F

... et adressées au Chef de Département par retour de courrier, suite à la note aux Chefs de Service BH-RPUG/553 du 18/7/79.

Enfin, les formulaires administratifs, portant sur l'attribution au Laboratoire de Biochimie de son poste de Scientifique et d'ACT 5B, ont été reçus et adressés dûment remplis à l'Administration. Il ne subsiste donc plus, à la fin de 1979, aucune des ambiguïtés administratives de structure et de fonctionnement qui ont entravé, pendant 5 ans, l'épanouissement scientifique du Laboratoire de Biochimie.

BIBLIOGRAPHIE

A - DERNIERS TITRES PARUS VENANT S'AJOUTER & LA LISTE DES TRAVAUX DU LABORATOIRE. *

(1) BOUNIAS, M. et PACHECO, H. (1979) - Effets hyperglycémiants de l'adrénaline injectée chez l'Abeille in vivo. C.R. Acad. Sc., 289D, 33-36.

(2) BOUNIAS, M. et PACHECO, H. (1979) - Sensibilité de la glycémie de l'Abeille à l'action de l'insuline et du glucagon injectés in vivo. C.R. Acad. Sc. 289D, 201-204.

(3) BOUNIAS, M. (1979) - Relations doses/effets de l'insuline et du glucagon sur la glycémie de l'Abeille. C.R. Soc. Biol., 173, 1031-1035

(4) BOUNIAS, M. (1979) - In vivo control of haemolymph-α-glucosidase kinetics by glycemic components, according to developmental stages of Apis mellifica (Hymenoptera ; Insecta). Comp. Biochem. 66B, 335-341.

(5) BOUNIAS, M. (1979) - Etude du mécanisme d'inhibition de l'activité α-glucosidasique de l'hémolymphe par le D-glucose in vitro au cours du développement de l'Abeille (Apis mellifica, mellifica L.). C.R. Soc. Biol., 173, 580-584.

(6) BOUNIAS, M. (1979) - Correlations between control and glucose-inhibition parameters of honeybees-haemolymph α-glucosidase-kinetics. Experientia, 36, 157-158.

B - IMPACT EXTERIEUR.

Les publications du laboratoire continuent à susciter de nombreuses demandes de tirés à part ainsi que des prises de contacts et demandes d'aide venant de l'extérieur. Cet aspect du bilan des travaux mérite d'être analysé sous trois angles différents : le nombre de demandes reçues par sujet traité, la distribution géographique des demandes, et enfin leur origine classée par catégories d'institutions.

a) Nombre de demandes par sujet traité.

Parmi les demandes parvenues en 1979 :

α-glucosidases : 36 (C.R. Soc. Biol., Experientia)**

Hormones : 107 (C.R. Acad. Sc. et Soc. Biol.)

A titre de comparaison, le cumul par sujets, au cours des 5 dernières années (de 1975 à 1979), s'établissait comme suit :

(*) Les travaux " sous presse " dont la parution n'interviendra qu'en 1980 ont été exclus de cette liste.

(**) Non compris le dernier titre paru dans Comp. Biochem.

Protéines Abeille ..	252
Acide ascorbique ...	50
Pyrale du riz	7 *
Glycémie	64
Glucosidases	229
Phosphatases	32
Hormones	107
	741

soit 148 demandes par an et par Chercheur.

b) Répartition géographique.

Dans l'ordre décroissant :

U.S.A. ...	34 (24%)	Pays Bas	4 (2,8%)	Mexique	1 (0,7%)
France ...	30 (21%)	Espagne	4 "	Suisse	1 "
R.F.A. ...	11 (7,7%)	U.R.S.S.	4 "	Chili	1 "
D.D.R. ...	10 (7%)	Suède	3 (2%)	Yougoslavie .	1 "
Canada ...	9 (6%)	Congo	3 "		
Autriche .	5 (3,5%)	Inde	3 "		
Japon	5 "	Brésil	2 (1,4%)		
G.B.	4 (2,8%)	Tchécoslovaquie .	2 "		
Belgique .	4 "	Afrique du sud ..	2 "		

Ces données peuvent être comparées au cumul précédent (1975-1978) soit :

U.S.A.	125 (25%)	Canada	24 (4,8%)	Espagne ..	2 (0,4%)
France	105 (21%)	Inde	23 (4,8%)	Guadeloupe	2 "
Allemagnes) Autriche) ...	44 (8,8%)	Amérique latine	23 "		
		Japon	13 (2,6%)		
G.B.	35 (7,2%)	Italie	10 (2%)		
Eur. centrale) — est)	34 (6,9%)	Afrique 8	8 (1,6%)		
		Suisse	7 (1,4%)		
Belgique) Pays) .. scandinaves)	27 (5,4%)	Australie	5 (1%)		
		Israël	5 "	Total :	494

Les deux sujets fondamentaux, régulation hormonale et régulation enzymatique de la glycémie appellent la même proportion de demandes des U.S.A. et de France, une augmentation du groupe Allemagnes-Autriche au détriment de la Grande Bretagne (où l'impact s'est toutefois " concrétisé " par une collaboration " sabbatique ") et des pays de l'Est,

ainsi qu'un léger accroissement depuis le Canada et le Japon.

c) Répartition des demandes par catégorie d'Institutions.

Au cours de 1979, les " demandeurs " peuvent se classer de la manière suivante :

- Instituts d'Etat et Universités de Sciences

  Biologie générale, Zoologie 52

  Biochimie, Chimie, Physiologie .. 43

  Agriculture 20

- Universités médicales

  Pathologie, Clinique 12

  Pharmacologie 3

  Chimie biol., Métabolisme .. 4

  Psychologie 2

- Instituts de Recherches Privés

  Médecine, Clinique 5

  Pharmacologie 4

  Physiologie, Neuroscience .. 2

  Biologie 2

La biologie fournit donc 36 % des demandes

La biochimie et la physiologie non médicales 30 %

La recherche médicale et pharmacologique 20 %

L'agriculture 13,5 %

Il est important de souligner la part importante prise par la Médecine. La rubrique " biologie " comprend également tout ce qui figure sous la mention " entomologie " : il est parfois difficile de distinguer entomologie agricole et entomologie générale, de sorte que les 13,5 % attribués aux seules " Facultés d'Agriculture " sont légèrement sous-estimés.

CONCLUSION

Le Laboratoire de Biochimie est maintenant doté d'une structure qui lui permet d'assurer à long terme le déroulement de ses programmes. Ceux-ci se rattachent à l'étude de la régulation du métabolisme glucido-lipidique de l'Abeille, et à ses applications.

Près de 750 demandes de tirés à part en moins de 5 ans, auxquelles s'ajoutent diverses correspondances et demandes d'aide scientifique de toutes natures, témoignent de l'intérêt suscité par les résultats publiés par le Laboratoire de Biochimie.

L'aspect fondamental de ce travail n'a pas échappé aux grands Instituts et aux Universités étrangères : il est réconfortant de constater à ce sujet que les pionniers de l'endocrinologie des Insectes, tels STEELE pour les premiers effets hyperglycémiques d'extraits de corpora cardiaca (Nature, London, 1961, 192, 480-481), OWEN pour la découverte de la noradrénaline dans le venin d'Abeilles (Experientia, 1971, 27, 544-545) etc., les principaux spécialistes américains des osidases de l'Abeille, comme TALBOT et HUBER (Can. J. Biochem., 1975, 53, 1106 et 1976, 54, 153), ainsi que les réalisateurs d'ouvrages de synthèse, comme GOODWIN, m'adressent maintenant leurs demandes de tirés à part.

Les applications agronomiques, ne concernent pas seulement l'Abeille comme producteur de miel (estimation des rendements) mais comme pollinisateur à protéger (manifestations d'intérêt de diverses Universités Médicales et Vétérinaires, à l'Est comme à l'Ouest) (figure 9) et dans un proche avenir, comme indicateur de toxicité agro-alimentaire, ce qui nous amène au point suivant.

Les applications médicales possibles proviennent en premier lieu des analogies de régulation hormonale de la glycémie des Abeilles avec celle des vertébrés. Pour les 6 derniers mois, 30 demandes de tirés à part proviennent de centres publics et privés de Recherche Médicale et Pharmacologique, et les travaux du Laboratoire de Biochimie sont régulièrement sélectionnés pour dépôt auprès des bibliothèques d'instituts de recherches sur le diabète, par exemple (figure 9).

L'aspect enzymologique n'est pas à négliger pour autant, puisque des recherches pharmacologiques liées à l'hyperglycémie et à l'insuline portent sur l'étude d'inhibiteurs des α-glucosidases chez l'homme ! (Dept. of Clinical Research, BAYER, RFA ; Publ. in : Research in Experimental Medicine, 1979, 175, 81-86).

... Un argument de plus montrant l'homogénéité scientifique du programme, face à la diversité de ses applications ...

Il est également significatif de constater que depuis plusieurs années, les auteurs répondent presque systématiquement à chacune des demandes de tirés à part venant du Laboratoire de Biochimie.

Tous ces éléments augurent favorablement de l'avenir du Laboratoire de Biochimie, qu'il s'agisse de ses programmes personnels ou de ses relations scientifiques extérieures, éclairées par la conclusion du rapport du DR. MORGAN :

" Most of all I am grateful to Michel BOUNIAS for providing the opportunity for participation in a period of intensive experimentation and for maintaining, throughout, a spirit of genuine collaboration and cooperation in pursuit of scientific objectives. This spirit of joint endeavour between colleagues is something I had not experienced for 12 years and I had almost forgotten the pleasure it can generate ; it was well worth a round trip of 2,000 miles to have my memory refreshed. "
(DR. M.R.J. MORGAN, Lancaster, December 1979).

LBC, 1979

Michel BOUNIAS
Docteur ès Sciences

Figure 9 - Quelques réactions extérieures aux récentes publications du LBC.

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DU LANGUEDOC
LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE DES INVERTEBRES
Place Eugène Bataillon
34060 MONTPELLIER CEDEX
Tél. : 63.91.44

Professeur Jean-G. LAGARRIGUE
Membre du C. C. U. (50ème Section)

Monsieur,

Très intéressé par votre note parue aux Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, 285, sur les Modifications d'activité des α-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeille au cours de la nymphose, je me permets de solliciter de votre part une entrevue.

En effet, Monsieur SEVILLA qui travaille dans mon - -tude de l'activité enzymatique dig-

B. U. SINGH,
Scientist S-1,
Division of Entomology

IARI-Regional Research Station,
Rajendranagar,
HYDERABAD-500 030 (AP) INDIA.

June 15, 1978

Dear Professeur le Dr. Boumias:

Receiving It would be very kind of you to arrange to expedite the despatch through par Avion as such we are very badly in need of your Collection of Publications and also request you to kindly arrange to place my name on your mailing list for receiving all your and team. Workers' publications, in future, as and when are they published which are of immense importance in our research activities.

Thanking you in anticipation.

With kind regards

Sincerely yours,
B. U. Singh.

.../...

Zentralinstitut für Diabetes
„Gerhard Katsch"
– Wissenschaftliche Bibliothek –
DDR - 2201 Karlsburg
Kreis Greifswald

DRUCKSACHE

Dr. M. Bounias
INRA, Ctr. Rech. Avignon,
Biochim. Lab.

F-84140 Montfavet

Frankreich

Sehr geehrter Herr Kollege,
Monsieur,
Dear Sir,
Многоуважаемый госп. коллега,

14.8.80

Darf ich Sie höflichst um einen Sonderdruck Ihrer Arbeit bitten:
Je vous serais très obligé s'il vous était possible de m'adresser un tirage à part de votre publication:
I would be grateful if you could send me a reprint of your article entitled:
Разрешите попросить у Вас экземпляр Вашего труда:
C.R. Soc. Biol. 173, (1979)6, S. 1031

Mit bestem Dank im voraus und vorzüglicher Hochachtung
Je vous en remercie d'avance et vous prie d'agréer l'expression de mes sentiments très distingués
Thanking you in advance Yours sincerely
С благодарностью и уважением

Büstrin

Best.-Nr. 525 46 m. E.

VV Spremberg Ag 312 79 2751 I 20 8 331

Your paper is selected for the information service about problems of diabetes mellitus

Zentralinstitut für Diabetes
„Gerhard Katsch" – Wiss. Bibliothek –
DDR – 2201 Karlsburg
Kreis Greifswald

GREIFSWALD 1

Dr. M. Bounias

INRA, Ctr. Rech. Avignon,
Biochim. Lab.

F-84140 Montfavet

Franco – Frankreich

Sehr geehrter Herr Kollege,
Monsieur,
Dear Sir,
Многоуважаемый госп. коллега,

Darf ich Sie höflichst um einen Sonderdruck Ihrer Arbeit bitten:
Je vous serais très obligé s'il vous était possible de m'adresser un tirage à part de votre publication:
I would be grateful if you could send me a reprint of your article entitled:
Разрешите попросить у Вас экземпляр Вашего труда:
C.R. Acad Sci. – Ser. D 289, (1979)2,
S. 201

Mit bestem Dank im voraus und vorzüglicher Hochachtung
Je vous en remercie d'avance et vous prie d'agréer l'expression de mes sentiments très distingués
Thanking you in advance Yours sincerely
С благодарностью и уважением

Büstrin

18 FEV. 1980

Best.-Nr. 525 46 m. E.

Spremberg Ag 3[illegible] DDR 2563 I 20 8 247

Your paper is selected for the information service about problems of diabetes mellitus

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE
SCIENCE AND EDUCATION ADMINISTRATION

AGRICULTURAL RESEARCH
WESTERN REGION
CARL HAYDEN BEE RESEARCH CENTER
2000 E. Allen Road
Tucson, AZ 85719

PRIORITY – AIR MAIL

Dear Dr. Bounias:

Thank you for the reprint of your excellent paper on intra-glycemic relationships. I can appreciate how much labor was involved. It arrived in the same mail as a paper "refuting" our finding that bees contain trehalose!

[illegible] this position in hopes of [illegible] your reprints [illegible]. I have enjoyed reading your papers. [illegible]

REQUEST FOR PUBLICA.

We would appreciate receiving the follow.

QUANTITY | TITLE OF PUBLICATION
2 | Experientia 36(2): 157

SEA FORM 14
JUN 1978

ANNEXE

BILAN DES PUBLICATIONS

(par ordre alphabétique des périodiques)

I- PUBLICATIONS ORIGINALES PARUES ET SOUS PRESSE*

* Références partielles = date d'enregistrement du manuscrit chez l'éditeur, volume et n° prévus.

A ANALUSIS (PARIS - MASSON)

1 BOUNIAS 1976 4(2), 87-93.
2 BOUNIAS 1980 8(7), 287-295.

ANNALES DE ZOOLOGIE - ECOLOGIE ANIMALE (VERSAILLES)

1 BOUNIAS & BONNOT 1976 8(4), 481-492.
2 " " 1977 9(4), 733-748.
3 BOUNIAS 1978 10(2), 289-302.

ANALYTICAL BIOCHEMISTRY (N.Y., U.S.A.)

1 BOUNIAS 1980 106, 291-295.

APIDOLOGIE (VERSAILLES)

1 BOUNIAS 1975 6(3), 207-218.
2 " " 6(3), 219-232.
3 " " 7(3), 249-262.
4 " " 7(3), 263-275.

ARABIDOPSIS INFORMATION SERVICE (GOTTINGEN/FRANKFURT - GERM.)

1 à 15 BOUNIAS 1972 à 1976 : 15 titres parus (Biochimie végétale).

ARCHIVES INTERNATIONALES DE BIOCHIMIE ET PHYSIOLOGIE (LIEGE)

1 BOUNIAS 1980 88(1), 93-98.

B BULLETIN DE LA SOCIETE ZOOLOGIQUE DE FRANCE (PARIS)

1 BOUNIAS 1977 102(3), 294-295.

C CANADIAN JOURNAL OF BOTANY (OTTAWA, CANADA)
(BIOCHEMISTRY SECTION)

1 BOUNIAS 1975 53(8), 708-719.

CHIMIE ANALYTIQUE (PARIS - MASSON)

1 BOUNIAS 1969 51(2), 76-82.

COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY (OXFORD, G.B.)

1 BOUNIAS 1978 61A, 13-18.
2 " 1979 63B, 407-417.
3 " 1980 66B(3), 335-341.
4 " 1981 (n° 916B - 28/10/80).

COMPTES RENDUS : ACADEMIE DES SCIENCES (PARIS)

1 BOUNIAS & PACHECO 1972 275D, 201-204.
2 " " 1974 279D, 691-694.
3 BOUNIAS 1975 285D, 53-56.
4 " 1977 285D, 261-264.
5 " 1977 285D, 1263-1266.
6 BOUNIAS & PACHECO 1979 289D, 33-36.
7 " " 1979 289D, 201-204.
8 BOUNIAS & MORGAN 1981 (Série D - 17/01/81).

COMPTES RENDUS : SOCIETE DE BIOLOGIE (Collège de Fr., PARIS)

1 BOUNIAS 1978 172(5), 855-859.
2 " 1979 173(3), 580-584.
3 " 1979 173(6), 1031-1035.
4 " 1980 174(6)
5 BOUNIAS & KRUK 1981 175(1) (2/12/80).
6 BOUNIAS & MORGAN 1981 175(1) (17/01/80).

E EXPERIENTIA (BAZEL, SCHWEIZ)

1 BOUNIAS 1979 36, 157-158.

G GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY (SHEFFIELD, G.B. / WASHINGTON, U.S.A.)

1 BOUNIAS & KRUK 1981 (n° C-115 - 23/12/80).

I INSECT BIOCHEMISTRY (BRISTOL, G.B.)

1 BOUNIAS 1980 10, 521-527.

J JOURNAL OF APICULTURAL RESEARCH (BUCKS., G.B.)

1 BOUNIAS 1981 (28/10/80).

R REVIEW OF APPLIED ENTOMOLOGY (G.P.)

1 BOUNIAS 1976 64(7), 1195.

2 BOUNIAS 1976 64(8), 1415.

II- PUBLICATIONS DE VULGARISATION ET OUVRAGES

BULLETIN D'INFORMATION DES RIZICULTEURS DE FRANCE

1 BOUNIAS 1972 139, 11-13.

BULLETIN TECHNIQUE DE L'APICULTURE

1 BOUNIAS 1976 3(4), 47-50.

ACTUALITES SCIENTIFIQUES ET AGRONOMIQUES (Masson Ed.)

1 - L'analyse Biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince (19/06/80).

III- COMMUNICATIONS ORIGINALES EN COLLOQUES / CONGRES

- Coll. Intergr. Photosynth. C.E.A.

1 Cadarache, mai 69 (p. 70-73) (BOUNIAS & KHAU-VAN-KIEN).

2 " " (p. 74-77).

- 2nd Int. Symp. on Arabid. Pes.

JN GOETHE UNIV. Frankfürt, sept. 76 : 1 (3 pp.) 2 (5 pp.).

- 2e Coll. INRA de Biochimie

  Maisons Alfort, 24 janv. 75 : 7 (7 pp.).

- IIe Coll. Physiol. Insectes " Physiologie du Développement "

  Strasbourg, 2-3 mai 75 : 1 (p. 37-40).

- 25e Congr. International Apic. APIMONDIA

  Grenoble, 8-4 sept. 75 : 1 (p. 304-301)
  2 (p. 268-270).

- 26e Int. Congr. Apic. APIMONDIA

  Adelaïde (Australie), oct. 77 : 1 (9 pp.).

- IVe Coll. Physiol. Insectes " Métabolisme de l'insecte "

  Bordeaux / Talence, 6-7 mai 77 : 1 (2 pp.).

- Coll. " Dosage des acides aminés " INRA - Theix, 13-14 mai 1980 (7 pp. 5 fig.).

IV- MEMOIRES DE DIPLOMES OU THESES

1967 - Mémoires DEA Biologie Générale et Appliquée - LYON.

1 (12 pp.)
2 (28 pp.).

1969 - Mémoire de Thèse Dr. Ing. LYON (n° d'ordre 308)

89 pp. - 150 réf. Bibl.

1972 - Mémoire de Thèse Doctorat d'Etat ès Sc. LYON (n° 98)

146 pp. - 255 Réf. Bibl. - 79 fig. - 145 tableaux num. - 10 planches photo microsc.